



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



PULMONER ARTER HİPERTANSİYONUNDA HİDROJEN SÜLFÜRÜN ROLÜ VAR MI?

Yüksek Lisans Tezi

Kumru TURHAN

Farmakoloji Ana Bilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**PULMONER ARTER HİPERTANSİYONUNDA
HİDROJEN SÜLFÜRÜN ROLÜ VAR MI?**

Kumru TURHAN

Danışman
Doç. Dr. Gülnur SEVİN

Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2020

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Gülnur SEVİN

Gülnur Sevin

Üye : Prof. Dr. Günay Yetik ANACAK

Günay Yetik

Üye : Prof. Dr. Nergis DURMUŞ

Nergis Durmuş

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:4. ŞUBAT. 2020.....

Önsöz

Pulmoner arteriyel hipertansiyon nadir rastlanan bir akciğer hastalığıdır. Bu hastalık, hastalar ve ailelerinin yaşam kalitelerini her anlamda ve ciddi boyutlarda engellemektedir. Günümüzde hala pulmoner arteriyel hipertansiyonun tedavisi bulunamamıştır. Uygulanan tedavilerle hastaların hayat kalitesi arttırılmaya ve semptomları azaltılmaya çalışılmaktadır. Ancak tüm çabalar hastalığın prognozuna bir çözüm getirememekte ve sonucu değiştirememektedir. Bu nedenle pulmoner arteriyel hipertansiyonda terapötik potansiyeli olan yeni ilaçların geliştirilmesi ve hastalığın tedavisi, yarattığı komplikasyonlar ve sağ kalım da dahil pek çok süreç açısından son derece önemlidir.

Çalışmamızda, insanlarda görülen bu hastalığı taklit etmek üzere literatürde en yaygın kullanılan modellerden biri olan monokrotalin ile indüklenmiş sıçan pulmoner arteriyel hipertansiyon modelinde hem *in vivo* koşullarda hidrojen sülfür tedavisinin hem de *in vitro* koşullarda hidrojen sülfür uygulamasının hastalığındaki rolü incelenmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli bilgileri ve deneyimleriyle yol gösteren, her zaman bana destek olan kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Gülnur SEVİN'e teşekkür ederim.

İzmir, 4.02.2020

Kumru TURHAN

Özet

Pulmoner Arter Hipertansiyonunda Hidrojen Sülfürün Rolü Var Mı?

Çalışmamızın amacı, MCT ile indüklenen PAH modelinde H₂S'in rolünü, hem H₂S üretimi hem de H₂S aracılı yanıtlar üzerinden araştırmaktır.

Erişkin erkek Wistar sıçanlar (250-300 g), kontrol, MCT, MCT+Na₂S ve Na₂S olmak üzere dört gruba ayrıldılar. Deneysel PAH modelini oluşturmak için, MCT (60 mg/kg, i.p.) sıçanlara tek doz olarak uygulandı. Kontrol ve MCT gruplarına fizyolojik salin çözeltisi; MCT+Na₂S ve Na₂S gruplarına ise Na₂S (2.5 mg/kg, i.p.) 21 gün boyunca verildi. 60 mg/kg ketamin-5 mg/kg ksilazin anestezisi altında sağ ventriküle 23 G branül ile girilerek sağ ventrikül basıncı ölçüldü. Sağ ventrikül hipertrofisini belirlemek için [sağ ventrikül/(sol ventrikül+septum)] oranı hesaplandı. İzole organ banyosu deneylerinde ana pulmoner arterler kullanıldı. KCl ön kastırma sonrası tek doz ACh ve fenilefrin ön kastırma sonrası kümülatif ACh gevşeme yanıtları alındı. H₂S'in rolünü değerlendirmek için fenilefrin ön kastırma sonrasında kümülatif L-sistein gevşeme yanıtları (AOAA varlığında/yokluğunda) ile kümülatif Na₂S gevşeme yanıtları alındı. Bazal veya L-cys ile uyarılmış akciğer ve pulmoner arter homojenatlarında H₂S düzeylerini ölçmek için MBA yapıldı.

Sağ ventrikül basıncı ve [sağ ventrikül/(sol ventrikül+septum)] oranı, kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı artarken MCT+Na₂S grubunda ise anlamlı olarak azalmıştır. KCl kasılma yanıtları kontrol grubuna göre MCT grubunda azalırken, bu azalma MCT+Na₂S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde normalize olmuştur. KCl ön kastırması ve fenilefrin ön kastırması sonrası alınan ACh gevşeme yanıtı kontrol grubuna göre MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Gevşemedeki bu azalma MCT+Na₂S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde normalize olmuştur. L-sistein gevşeme yanıtları, kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda anlamlı düzeyde azalmış ve bu gevşemeler MCT+Na₂S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Gevşemedeki bu artış AOAA ile tersine çevrilmemiştir. Na₂S ile indüklenen gevşeme yanıtları, kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış ve bu gevşemeler MCT+Na₂S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Akciğer dokusunda bazal H₂S düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. L-sistein ile uyarılmış akciğer dokusunda kontrol grubuna kıyasla

MCT grubunda H₂S düzeylerinde anlamlı bir azalma görülmüş, bu azalma MCT+Na₂S grubunda bir miktar düzelmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmamıştır. Pulmoner arterlerde bazal H₂S düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmezken; L-sistein varlığında, kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda H₂S düzeyi anlamlı düzeyde azalmış ve MCT+Na₂S grubunda MCT grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır.

In vivo Na₂S tedavisi, PAH'da PAB, sağ ventrikül hipertrofisi ve endotel disfonksiyonunu düzeltmektedir. Pulmoner arterlerde azalan H₂S seviyelerini ve L-sistein gevşemelerini arttırmaktadır. L-sistein gevşemelerindeki bu artış AOAA varlığında geri dönmediğinden bu etki, CSE/CBS aracılı endojen H₂S üretiminden bağımsızdır. Oluşan bu yararlı etkiler, endojen H₂S üretiminin diğer sorumlu enzimi olan 3-MST'den ya da Na₂S'in H₂S donörü gibi davranmasından kaynaklanabilir. PAH varlığında azalan eksojen Na₂S gevşemelerinin *in vivo* tedavi sonrasında düzelmesi, aynı zamanda H₂S kaynaklı alt mekanizmaların da PAH'dan etkilendiğini göstermektedir. Sonuçlarımız, PAH'da H₂S düzeylerinin ve H₂S aracılı yanıtların bozulduğunu, *in vivo* Na₂S tedavisinin H₂S'i artırarak terapötik etkinlik gösterebileceğini ve H₂S hedefli tedavilerin PAH'daki önemini işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler; Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon; Hidrojen Sülfid; Sistein; Vazodilatör Ajanlar; Hipertrofi; Wistar Sıçan.

Abstract

Is There Any Role of Hydrogen Sulfide in Pulmonary Arterial Hypertension?

The aim of our study was to examine the role of H₂S in the model of MCT-induced PAH in rats through both H₂S production and H₂S-mediated responses.

Adult male Wistar rats (250-300 g) were divided into four groups: control, MCT, MCT+Na₂S and Na₂S. MCT (60 mg/kg, i.p.) was administered as a single dose to induce the experimental PAH model. Physiological saline was given to control and MCT groups; MCT+Na₂S and Na₂S groups were administered Na₂S (2.5 mg/kg, i.p.) for 21 days. Under 60 mg/kg ketamine-5 mg/kg xylazine anaesthesia, a 23 G needle placed into the RV and RVP was measured. The ratio of [RV/(LV+S)] was calculated to determine the index of RV hypertrophy. The main PAs were used for vascular reactivity. First, PAs were pre-contracted with KCl and relaxed with a single dose of ACh. To investigate endothelial dysfunction, cumulative ACh relaxations were taken in the presence of Phe. In order to investigate the vasodilatory effect of H₂S; the vasorelaxant responses to L-cysteine (L-cys) were obtained by using myograph in the presence/absence of AOAA (30 min., 2 mM). Cumulative Na₂S vasorelaxations were also taken. To measure H₂S levels in PA and lung homogenates, MBA was applied in the basal or L-cyst induced conditions.

While RVP and RV/(LV+S) ratio was significantly increased in MCT group compared to control group, there was a significantly decrease in MCT+Na₂S group. KCl contraction were reduced significantly in MCT group compared to control group. This decrease was normalized in MCT+Na₂S group. ACh relaxations after KCl and Phe pre-contractions were reduced in MCT group compared to the control group but improved in MCT+Na₂S group. Relaxation to L-cys significantly reduced in MCT group compared to the control group. These relaxations increased in MCT+Na₂S group. AOAA did not reversed these relaxations. Na₂S-induced relaxations decreased significantly in MCT group compared to the control group but increased in MCT+Na₂S group. There was a significant difference on H₂S levels in lung tissues in the presence of L-cys, but no in basal condition. There was also no difference in the basal H₂S level of the PAs. However, H₂S formation was significantly decreased in MCT group compared to control group in the presence of L-cys and this decrease was reversed in MCT+Na₂S group.

In vivo Na₂S treatment improved PAP, right ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in PAH. It increased H₂S levels and L-cysteine relaxation in pulmonary arteries. This effect is independent of CSE/CBS-mediated endogenous H₂S production as this increase in L-cysteine relaxations did not return in the presence of AOAA. These beneficial effects can be caused either by the 3-MST which was the other enzyme of endogenous H₂S production, or by its acting as H₂S donor. The reduction of exogenous Na₂S relaxations in the presence of PAH showed that the sub-mechanisms of H₂S are also affected by PAH.

Our results suggest that H₂S levels and H₂S-mediated responses are impaired in PAH. *In vivo* Na₂S therapy may have therapeutic efficacy by increasing H₂S and shows the importance of H₂S-targeted therapies in PAH.

Keywords; Pulmonary Arterial Hypertension; Hydrogen Sulfide; Cysteine; Vasodilator Agents; Hypertrophy; Rats, Wistar.

İçindekiler

Önsöz.....	I
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini	IX
Şekiller Dizini.....	X
Resimler Dizini.....	XI
Kısaltma Listesi.....	XII
Giriş.....	1
Genel Bilgiler	3
1.1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonun Tanımı.....	3
1.2. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonun Patogenezi	3
1.3. Pulmoner Hipertansiyon Semptomları ve Sınıflandırılması	4
1.4. Pulmoner Hipertansiyon Tedavisi	6
1.5. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda Hidrojen Sülfür'ün Rolü	7
1.6. Monokrotalin ile İndüklenen Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Modeli	8
Gereç ve Yöntem.....	9
2.1. Deneyde Kullanılan Hayvanlar	9
2.2. Deneyde Kullanılan İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması	11
2.2.1. <i>İn-vivo</i> Kullanılan İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması	11
2.2.2. İzole Organ Banyosunda Kullanılan İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması.....	11
2.2.3. Krebs Çözeltilisinin Hazırlanması	12
2.2.3.1. Konsantre Krebs (x20) Hazırlanması	12
2.2.3.2. Normal Krebs Hazırlanması	12
2.3. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Modelinin Oluşturulması	13
2.4. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda Na ₂ S Tedavisi.....	13
2.5. Sağ Ventrikül Basıncının Ölçülmesi	14
2.6. Sağ Ventrikül Hipertrofisinin Ölçülmesi	15
2.7. İzole Organ Banyosu Deneyleri	16
2.8. Doku Homojenizasyonu	18
2.9. Total Protein Hesaplama	19
2.10. H ₂ S Düzeylerinin Ölçülmesi.....	20

2.11. İstatistiksel Analiz	21
Bulgular.....	22
3.1. MCT Uygulaması ve Na ₂ S Tedavisinin Sıçan Sağ Ventrikül Basıncı Üzerine Etkisi.....	22
3.2. MCT Uygulaması ve Na ₂ S Tedavisinin Sıçan Sağ Ventrikül Hipertrofisi Üzerine Etkisi.....	22
3.3. İzole Organ Banyosunda Sıçan Ana Pulmoner Arter Yanıtları.....	23
3.3.1. Potasyum Klorür (KCl) Yanıtları.....	23
3.3.2. KCl Sonrası Tek Doz (10 ⁻⁵ M) ACh Gevşeme Yanıtları	24
3.4. Fenilefrin Ön kastırma Sonrası Kümülatif Asetilkolin Gevşeme Yanıtları.....	25
3.5. Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif L-sistein Yanıtları	26
3.6. AOAA (2 mM) varlığında Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-sistein Yanıtları	28
3.7. Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif Na ₂ S Yanıtları	29
3.8. MCT Uygulaması ve Na ₂ S Tedavisinin Sıçan Akciğer ve Pulmoner Arterindeki H ₂ S Düzeyleri Üzerine Etkisi	30
3.8.1. Akciğer Dokusunda H ₂ S Düzeyleri.....	30
3.8.2. Pulmoner Arter H ₂ S Düzeyleri	31
Tartışma	33
Sonuç ve Öneriler.....	42
Kaynaklar	43
Ekler	50
Teşekkür.....	51
Özgeçmiş	52

Tablolar Dizini

Tablo 1: Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) tarafından yayınlanan güncel ESC kılavuzuna göre PH sınıflandırması (Galie`*, 2016).....	5
Tablo 2: Deneylede Kullanılan Cihazlar	9
Tablo 3: Deneylede Kullanılan Kimyasal Maddeler	10
Tablo 4: Konsantre Krebs Hazırlamada Kullanılan Maddeler	12
Tablo 5: Normal Krebs Hazırlamada Kullanılan Maddeler	12
Tablo 6: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Asetilkolin Duyarlılığı.....	26
Tablo 7: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-sistein Duyarlılığı.....	28
Tablo 8: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Na₂S Duyarlılığı	30



Şekiller Dizini

Şekil 1: Sıçanlardaki Sağ Ventrikül Basınçları	22
Şekil 2: Sıçanlarda Sağ Ventrikül Hipertrofisi	23
Şekil 3: Sıçan Ana Pulmoner Arterinde 60 mM KCl Kasılma Yanıtları	24
Şekil 4: Sıçan Ana Pulmoner Arterinde 60 mM KCl Sonrası Tek Doz (10^{-5} M) ACh Gevşeme Yanıtları	25
Şekil 5: Sıçan Ana Pulmoner Arterinde Fenilefrin Ön kastırma (10^{-6} M) Sonrası Kümülatif Asetilkolin Gevşeme Yanıtları	26
Şekil 6: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif L-sistein Yanıtları (Kontrol, MCT ve MCT+Na ₂ S)	27
Şekil 7: 2 mM AOAA İnkübasyonlu Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif L-sistein Yanıtları (MCT, MCT+Na ₂ S ve MCT+Na ₂ S+AOAA)	28
Şekil 8: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif Na ₂ S Yanıtları (Kontrol, MCT ve MCT+Na ₂ S)	29
Şekil 9: Akciğer dokusunda bazal H ₂ S düzeyleri.....	30
Şekil 10: L-sistein inkübasyonu varlığında akciğer dokusundaki H ₂ S düzeyleri	31
Şekil 11: Pulmoner arterlerde bazal H ₂ S düzeyleri	32
Şekil 12: L-sistein inkübasyonu varlığında pulmoner arterlerdeki H ₂ S düzeyleri	32

Resimler Dizini

Resim 1: Kateter ile Sağ Ventrikül Basıncının Ölçümü	14
Resim 2: Kan Basınç Transduseri (dönüştürücüsü)	15
Resim 3: Basınç Kayıt Sistemi (Powerlab Veri Kayıt Sistemi)	15
Resim 4: Sıçan Pulmoner Arter İzolasyonu	17
Resim 5: İzole Organ Banyosu (DMT Miyograf)	17
Resim 6: Homojenizatör (Retsch, CryoMill)	18
Resim 7: Soğutmalı Santrifüj (Hettich Lab Technology)	19
Resim 8: Varioscan Çok Modlu Plak Okuyucu (Thermo Scientific)	20



Kısaltma Listesi

3-MP	: 3-Merkaptopruvat
3-MST	: 3-Merkaptopruvat Sülfürtransferaz
5-HT	: 5-Hidroksitriptamin, Serotonin
ACh	: Asetilkolin
AOAA	: Aminooksii Asetik Asit
BCA	: Bikinkoninik Asit Analizi
BDH	: Bağ Dokusu Hastalıkları
BH ₄	: Tetrahidrobipterin
Ca ²⁺	: Kalsiyum İyonu
CAT	: Sistein Aminotransferaz
CBS	: Sistatyonin Beta Sentaz
CO	: Karbonmonoksit
CSE	: Sistatyonin Gama Liyaz
CYP3A4	: Sitokrom P-450 3A4
DKH	: Doğuştan Kalp Hastalığı
DPD	: N, N-Dietil- <i>p</i> -fenilendiamin
EDRF	: Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör
eNOS	: Endotelyal NOS
ERA	: Endotelin Reseptör Antagonistleri
ERS	: Avrupa Solunum Derneği

ESC	: Avrupa Kardiyoloji Derneği
ET-1	: Endotelin-1
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FMN	: Flavin Mononükleotid
GTP	: Guanozin Trifosfat
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IPr	: Prostatiklin Reseptörü
iNOS	: İndüklenebilir NOS
KKB	: Kalsiyum Kanal Blokeri
KTEPH	: Kronik Tromboembolik Pulmoner Hipertansiyon
MCT	: Monokrotalin
MCTP	: Monokrotalin PiroI
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
nNOS	: Nöronal NOS
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
PAB	: Pulmoner Arter Basıncı
PABo	: Ortalama Pulmoner Arter Basıncı
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör

PAG	: Propargilglisin
PAH	: Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon
PAUB	: Pulmoner Arter Uç Basıncı
PDE5	: Fosfodiesteraz-5
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGI ₂	: Prostaglandin
PH	: Pulmoner Hipertansiyon
PKH	: Pulmoner Kapiller Hemanjiyomatoz
PLP	: Pridoksal 5' Fosfat
PMSF	: Fenilmetilsülfonil Florür
PPHN	: Yenidoğan Persistan Pulmoner Hipertansiyonu
PVD	: Pulmoner Vasküler Direnç
PVOH	: Pulmoner Venooklüzif Hastalık
sGC	: Çözünür Guanilat Siklaz
sGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
SKK	: Sağ Kalp Kateterizasyonu
TCA	: Trikloroasetik Asit
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TXA ₂	: Tromboksan A ₂
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WU	: Wood Ünitesi



Giriş

Pulmoner hipertansiyon (PH), pulmoner arter basıncının (PAB) ve pulmoner vasküler direncin (PVD) yükselmesiyle karakterize ilerleyici sağ kalp yetmezliği ile sonuçlanan mortalite riski yüksek multifaktöriyel bir hastalıktır (Trina K. Jeffery ve Wanstall, 2001; Sztuka ve Jasińska-Stroschein, 2017). Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) ise prekapiller pulmoner arter basıncında yükselmeye neden olan hastalıkların eşlik ettiği bir pulmoner hipertansiyon alt tipidir (Ishak Gabra ve diğerleri, 2019). Hastalığın patogenezinde yer alan vasküler yeniden yapılanma, vazokonstriksiyon ve tromboz, pulmoner vasküler direncin artmasına ve pulmoner arter basıncının yükselmesine yol açmaktadır (Nogueira-Ferreira, Vitorino, Ferreira ve Henriques-Coelho, 2015; Tuder ve diğerleri, 2013).

PH ayırıcı tanısı, kapsamlı inceleme ve multidisipliner yaklaşım gerektirmektedir. Hastada tanı koyma süreci, PH nedenlerinin sorgulanması ve diğer hastalıkların dışlanması ile olur. Sol kalp ve akciğer hastalıkları dışlanmışsa kronik tromboembolik PH (KTEPH) için sintigrafi yapılır. Bu da dışlanırsa sağ kalp kateterizasyonu (SKK) yapılarak Grup 1 PH (PAH) tanısı doğrulanır. $PABo \geq 20$ mmHg, $PAUB < 15$ mmHg ve $PVD > 3$ WU ise öncelikle diğer hastalıklarla ilişkili bir PAH olup olmadığına bakılır. Bu amaçla anamnez ve gerekli tetkiklerle doğuştan kalp hastalıkları (DKH), bağ dokusu hastalıkları (BDH), HIV, portal hipertansiyon, ilaç ve toksinlere maruziyet araştırılır. Tüm bu olasılıklar dışlanırsa hasta ya kalıtsal PAH ya da idiyopatik PAH'tır (Kucukoglu, 2016).

ESC'nin güncel kılavuzuna göre PAH hastalarının tedavisi genel önlemler, destekleyici tedavi ve spesifik tedavi olmak üzere 3 aşamada ele alınmaktadır (Galie*, 2016). Son yıllarda PAH tedavisi, hedefe yönelik tedavi protokolleri geliştirilmesi ile oldukça ilerlemiş olmasına rağmen yine de günümüzde oldukça yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkilidir (Lan, Massam, Kulkarni ve Lang, 2018; Parikh, Bhardwaj ve Nair, 2019).

Hidrojen sülfürün (H_2S) düz kaslarda gevşetici etkisinin olduğu bilinmektedir (Hosoki, Matsuki ve Kimura, 1997). H_2S donörü NaHS'in doza bağımlı olarak bronşiyal karsinomlu hastalardan alınan izole insan pulmoner arterlerinde gevşeme ve izole perfüze insan akciğer modelinde pulmoner arter ve bronşiyal basınçta azalma sağladığı gösterilmiştir (Ariyaratnam, Loubani ve Morice, 2013). Pulmoner arter şant

modeli ile yüksek pulmoner kan akımı oluşturulan sıçanlarda, eksojen H₂S kaynağı olan NaHS ile tedavinin pulmoner arter düz kas hücrelerindeki anormal apoptozu azaltarak damarın yeniden yapılanmasını engellediği belirtilmektedir (W. Li ve diğerleri, 2009).

Literatürdeki tüm bu bilgilere dayanılarak çalışmamızda, pulmoner arteriyel hipertansiyon varlığında H₂S'in rolü, hem H₂S üretimi hem de H₂S aracılı yanıtlar üzerinden incelenmiştir. Buna göre çalışmamızın amacı;

1. MCT (60 mg/kg, i.p.) ile pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) oluşturulmuş sıçanlara *in vivo* H₂S donörü Na₂S (2.5 mg/kg, i.p.) uygulamasının kan basıncı ve kalp hipertrofisi üzerindeki etkilerini,

2. Pulmoner arterlerde H₂S ile indüklenen gevşeme yanıtları ve diğer damar yanıtları üzerinde PAH ve Na₂S tedavisinin etkilerini,

3 PAH'ın ve *in vivo* H₂S donörü Na₂S tedavisinin H₂S düzeyleri üzerindeki etkilerini inceleyerek H₂S'in pulmoner arter hipertansiyonundaki olası tedavi edici potansiyelini araştırmaktır.

Pulmoner arteriyel hipertansiyonda H₂S'in yararlı etkileri bulunduğu takdirde H₂S'i hedefleyen ilaçların PAH tedavisinde etkili olabileceğini ve yeni tedavi seçenekleri olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Genel Bilgiler

1.1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonun Tanımı

Pulmoner hipertansiyon (PH), pulmoner arter basıncının ve vazokonstriksiyonunun artması ile karakterize, sağ ventrikül yetmezliği ve ölüme neden olan ilerleyici, karmaşık ve nadir görülen bir hastalıktır (Ilgin, Burukoglu, Atli ve Sirmagul, 2012; M. Zhang ve diğerleri, 2019). Şubat 2018'de düzenlenen 6. Dünya PH Sempozyumu'ndaki son güncellemelerle pulmoner PH'nin hemodinamik tanımı değişmiştir. Buna göre normal ortalama pulmoner arter basıncı (PABo) yaklaşık 14 ± 3.3 mmHg olarak kabul edilirken; PH, PABo > 20 mmHg olarak tanımlanmıştır (Condon, Nickel, Anderson, Mirza ve de Jesus Perez, 2019). PAB için sağ kalp kateterizasyonu (SKK) aracılığıyla pulmoner arter uç basıncı (PAUB), pulmoner vasküler direnç (PVD), diyastolik basınç farkı, kalp debisi ölçümleri yapılır ve bu ölçümlerin sonuçlarına göre farklı hemodinamik PH tanımları bulunmaktadır. Güncel kılavuza göre PAH; akciğer hastalıkları, kronik tromboembolik PH veya diğer prekapiller PH nedenleri olmaksızın, PAUB ≤ 15 mmHg, PVD > 3 wood ünitesi (WU) ile tanımlandığı ve prekapiller PH varlığıyla ayırt edilen PH hasta grubunu ifade eder (Kucukoglu, 2016).

1.2. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonun Patogenezi

PAH multifaktöriyel patobiyolojiye sahiptir ve bu gruba dahil olan tüm hastalıklarda akciğer dokusunun histolojisinde intimal fibrozis, medya kalınlığında artış, pulmoner arter obstrüksiyonu ve pleksiform lezyonlar görülmektedir (Harrison W. Farber, M.D., and Joseph Loscalzo, M.D., 2004). Pulmoner vasküler duvardaki her bir hücre tipi (endotel, düz kas, fibroblast) hastalıkta spesifik bir rol oynar (T. K. Jeffery ve Morrell, 2002). Ayrıca şiddetli PH'daki en önemli özellik neointima ve hücre dışı matriks oluşumudur. PH'nin patogenezinde öne çıkan üç temel mekanizma; vazokonstriksiyon, vasküler yeniden yapılanma ve trombozdur. PH gelişimindeki ilk basamağın pulmoner vazokonstriksiyon olduğu ve bunun endotel disfonksiyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Humbert ve diğerleri, 2004; Yildiz, 2009). Endotel disfonksiyonun başlangıç uyararı tam bilinmese de hipoksi, shear stres, inflamasyon, genetik duyarlılık, ilaç veya toksinlere yanıt olarak gelişmektedir. Endotel disfonksiyonu, pulmoner endotel hücreleri tarafından üretilen ve normal koşullarda

denge halinde olan vazokonstriktör ve proliferatif mediyatörler ile [serotonin (5-HT), endotelin (ET-1), tromboksan A₂ (TXA₂)], vazodilatör ve anti-proliferatif mediyatörler [prostasiklin (PGI₂), nitrik oksit (NO), düz kas hücrelerindeki potasyum kanalları] arasındaki dengenin bozulmasına neden olur (Humbert ve diğerleri, 2004; Öngen, 2011). Proliferatif endotel hücreler, neden oldukları vazokonstriksiyon ve vasküler yeniden yapılanma sonucunda pulmoner vasküler duvarda kalınlaşmaya yol açarak pleksiform lezyonlara neden olurlar (Yildiz, 2009). Bu lezyonların gelişiminde ve vasküler obstrüksiyonda büyüme faktörü genlerindeki mutasyonların da katkısının olduğu düşünülmektedir. Pulmoner endotel tabakasının işlevlerinden biri olan fibrinoliz ve trombozun önlenmesi PAH'ın da dahil olduğu birçok pulmoner hipertansiyon türünde bozulmaktadır ve bu durum tromboz ile sonuçlanmaktadır. Akciğer damarlarındaki hasar veya shear stresin bu işlev bozukluğuna neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca trombositler ile pulmoner arter duvarı arasındaki etkileşim sonucunda, trombositler pıhtılaşma fonksiyonlarına ek olarak çeşitli mediyatörleri [5-HT, TXA₂, trombosit aktive edici faktör (PAF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi] depolayıp salıvererek pulmoner arterlerde vazokonstriksiyona ve vasküler yeniden yapılanmaya katkıda bulunurlar (Humbert ve diğerleri, 2004).

1.3. Pulmoner Hipertansiyon Semptomları ve Sınıflandırılması

PH klinik belirtileri her zaman sağ ventrikül disfonksiyonu ile ilişkilidir. Başlangıçta oluşan oksijen taşınmasındaki bozulma ve kardiyak outputtaki azalma; sağ ventrikül hipertrofisi, sempatik yanıtlar ve dilatasyon upregülasyonu ile kompanse edilir. Bu nedenle hastalığın erken evresinde semptomlar yoktur veya spesifik değildir. Bundan dolayı çoğu olguda geç tanı konmaktadır. Hastalardaki bulgular: efor dispnesi, senkop, yorgunluk, bacak ödemi, göğüs ağrısı, çarpıntı, ses kısıklığı, abdominal distansiyon, Raynaud fenomenidir (Bhatnagar, Wiesen, Dweik ve Chaisson, 2018; Galie, N. Hoepfer, M. M. Humbert ve diğerleri, 2009; Öztürk ve Sahin, 2009). 1973 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından İsviçre Cenevre'de ilk PH toplantısı düzenlenmiştir (Condon ve diğerleri, 2019). 2. PH toplantısı ise 1998'de Fransa Evian'da düzenlenerek PH beş kategoriye ayrılmıştır. 2008'de Kaliforniya, Dana Point'de yapılan 4. dünya sempozyumunda Evian sınıflandırmasında bazı değişiklikler

yapılarak belirsizlikler giderilmiş ve yeni keşifler sınıflandırmaya dahil edilmiştir (Foshat ve Boroumand, 2017) (Tablo 1).

Tablo 1: Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) tarafından yayınlanan güncel ESC kılavuzuna göre PH sınıflandırması (Galie`*, 2016)

1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon	1.1. İdiyopatik (IPAH)	
	1.2. Kalıtsal (HPAH)	1.2.1. BMPR2 mutasyonu 1.2.2. Diğer mutasyonlar
	1.3. İlaç ve toksinlere bağlı	
	1.4. Diğer hastalıklara bağlı	1.4.1. Bağ dokusu hastalıkları 1.4.2. HIV enfeksiyonu 1.4.3. Portal hipertansiyon 1.4.4. Doğumsal kalp hastalığı 1.4.5. Şistozomiyaz
1'. Pulmoner venooklüzif hastalık (PVOH) ve/veya pulmoner kapiller hemanjiyomatoz (PKH)	1'.1. İdiyopatik	
	1'.2. Kalıtsal	1'.2.1. EIF2AK4 mutasyonu 1'.2.2. Diğer mutasyonlar
	1'.3. İlaç, toksin ve radyasyona bağlı	
	1'.4. Diğer hastalıklara bağlı	1'.4.1. Bağ doku hastalığı 1'.4.2. HIV enfeksiyonu
1''. Yenidoğan persistan pulmoner hipertansiyonu (PPHN)		
2. Sol kalp hastalığına bağlı pulmoner hipertansiyon	2.1. Sol ventrikül sistolik işlev bozukluğu	
	2.2. Sol ventrikül diyastolik işlev bozukluğu	
	2.3. Valvüler hastalık	
	2.4. Doğumsal/edinilmiş sol kalp giriş/çıkış sistem tıkanıklığı ve doğumsal kardiyomiyopatiler	
	2.5. Doğumsal/edinilmiş pulmoner ven darlığı	
3. Akciğer hastalıkları veya hipoksiye bağlı pulmoner hipertansiyon	3.1. Kronik obstrüktif pulmoner hastalığı	
	3.2. İnterstisyel akciğer hastalığı	
	3.3. Karma restriktif ve obstrüktif yapıda diğer pulmoner hastalıklar	
	3.4. Uykuda solunum bozukluğu	
	3.5. Alveoler hipoventilasyon bozuklukları	
	3.6. Kronik olarak yüksek irtifaya maruz kalma	
	3.7. Gelişimsel akciğer hastalıkları	
4. Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon ve diğer pulmoner arter obstrüksiyonları	4.1. Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon (KTEPH)	
	4.2. Diğer pulmoner arter obstrüksiyonları	4.2.1. Anjiosarkom 4.2.2. Diğer intravasküler tümörler 4.2.3. Arterit 4.2.4. Doğumsal pulmoner arter darlıkları 4.2.5. Parazitler (Hidatidoz)

5.Mekanizmaları belirsiz ve/veya çok faktörlü pulmoner hipertansiyon	5.1.Hematolojik bozukluklar: splenektomi, kronik hemolitik anemi, miyeloproliferatif hastalıklar
	5.2.Sistemik bozukluklar: sarkoidoz, pulmoner histiositozis, lenfanjioleiomyomatozis, nörofibromatoz
	5.3.Metabolik bozukluklar: glikojen depo hastalığı, Gaucher hastalığı, tiroid hastalığı
	5.4.Diğerleri: pulmoner tümöral trombotik mikroanjiyopati, fibrozan mediastinit, kronik böbrek yetmezliği (diyalizli/diyalizsiz), segmental pulmoner hipertansiyon

1.4. Pulmoner Hipertansiyon Tedavisi

PH'nın tedavisi hastalığın semptomlarını düzeltmeye yöneliktir. PH tedavisi hastanın gereksinimlerine, hastalığın türüne ve ciddiyetine bağlıdır (Hooper ve diğerleri, 2017). Tedavide ilk seçenek ilaç tedavisidir, bunun yetersiz kaldığı durumlarda mortaliteyi önlemek amacıyla cerrahi yöntemlere de başvurulur. Cerrahi yöntemler riskleri nedeniyle kronik stabilize vakalarda uygulanabilir. ESC'nin güncel kılavuzuna göre PAH hastalarının tedavisi; genel önlemler, destekleyici tedavi ve spesifik tedavi olmak üzere 3 aşamada ele alınmaktadır. 2015 Güncel PH Kılavuzu'na göre PAH tedavisinde önerilen genel önlemler; hamilelikten kaçınmak, grip ve pnömokok enfeksiyonuna karşı aşı, psikososyal destek, gerekli durumlarda oksijen desteği, cerrahi operasyonlarda epidural tercihi, denetimli egzersiz, aşırı fiziksel aktivitelerden kaçınmak ve genetik rehberlik almak şeklinde sıralanabilir. Destekleyici tedaviler; oral antikoagülan tedavisi, diüretikler, oksijen tedavisi, digoksin uygulamasıdır. Spesifik tedaviler; kalsiyum kanal blokerleri, endotelin reseptör antagonistleri, fosfodiesteraz-5 inhibitörleri, guanilat siklaz stimülatörleri, prostasiklin analogları, prostasiklin reseptör agonistleri olarak sıralanmaktadır (Galie*, 2016). Kalsiyum kanal blokerleri (KKB), PAH tedavisinde yaygın kabul gören ilk vazodilatör ajanlardır (Medarov ve Judson, 2015). Güncel ESC/ERS kılavuzu IPAHA, HPAHA ve ilaca bağlı PAH hastalarında yüksek doz KKB tedavisi için vazoreaktivite testi yapılmasını önermektedir (Galie*, 2016; Ishak Gabra ve diğerleri, 2019). Bir prostasiklin analogu olan epoprostenol 1995'te FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan ilk PAH tedavisidir (Montani ve diğerleri, 2014). Günümüzde geliştirilen PAH tedavilerinin karşılaştırılmasında altın standart hala epoprostenol olarak kabul edilmektedir (Parikh ve diğerleri, 2019).

1.5. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda Hidrojen Sülfür'ün Rolü

Biyolojik rolü belirlenmeden önce hidrojen sülfür (H_2S) kendine has çürük yumurta kokusu ile zehirli bir gaz olarak kabul edilmiştir. İlk kez Hosoki ve ark. (1997) tarafından H_2S 'in düz kas gevşetici etkisinin gösterilmesi ile H_2S 'in fizyolojik bir rolü olduğu ortaya çıkmıştır. Wang ve ark. çalışmalarında (2003), bu etkinin K_{ATP} kanallarının açılması ile gerçekleştiğini kanıtlanmıştır. H_2S 'in pek çok hücre ve dokuda eksprese edildiği, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda çeşitli hücre fonksiyonlarının önemli bir aracısı olduğu gösterilmiştir (Whiteman ve diğerleri, 2015). H_2S hem enzimatik hem de non-enzimatik yollardan üretilen biyolojik aktif bir gazdır. Biyolojik fonksiyonlar için üretilen H_2S 'in büyük bir kısmı enzimatik yolla sentezlenmektedir. H_2S sentezleyen üç enzim bulunur: sistasyonin beta sentaz (CBS), sistasyonin gama liyaz (CSE), 3-merkaptopruvat sülfürtransferaz (3-MST). L-sistein her üç enzim için de ana substrattır. Bunlardan CBS ve CSE, direkt L-sisteini kullanarak H_2S üretirler. 3-MST ise önce L-sistein ve α -ketoglutaratın sistein aminotransferaz (CAT) enzimi aracılığıyla 3-merkaptopruvat (3-MP) oluşturmaktan sonra devreye girerek 3-MP'den H_2S sentezler. CBS ve CSE, H_2S sentezinde kofaktör olarak vitamin B₆ yani pridoksal 5' fosfatı (PLP) kullanılır (Papapetropoulos, Whiteman ve Cirino, 2015; Whiteman ve diğerleri, 2015). CBS ve CSE sitozolde, 3-MST ise esas olarak mitokondride ve saptanabilir ölçüde de sitoplazmada lokalizedir. CSE memelilerde kardiyovasküler sistemde ve solunum sisteminde fazla miktarda olmakla birlikte bunun dışında karaciğer, vasküler ve non-vasküler düz kaslarda da bulunmaktadır (Szabó, 2007; R. Wang, 2012). CSE'nin, seçici ve geri dönüşümsüz olarak propargilglisin (PAG) ile inhibe edildiği bilinmektedir. AOAA (aminooksiasetik asit) ise aminotransferazlar için genel bir inhibitördür. *In vivo* ve *in vitro* koşullarda L-sistein tarafından oluşturulan vazodilatasyonu geri çevirdiği ve her iki H_2S enziminin (CSE, CBS) inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Asimakopoulou ve diğerleri, 2013). 3-MST, CBS ve CSE'ye benzer şekilde kardiyak hücrelerde, karaciğerde perikentral hepatositlerde, böbreğin proksimal tübüler epitelinde, beyin gibi birçok dokuda eksprese edilir. PH'de önemli patofizyolojik süreçlerden biri pulmoner arter düz kas hücrelerinin anormal apoptozudur. Bu durum düz kas hücrelerinde yapısal değişikliğe ve yeniden modellenmeye yol açar. Li ve arkadaşları PAH oluşturdukları sıçanlarda *in vivo* koşullarda CSE inhibitörü olan PAG ile tedavinin bu yeniden modellenmeyi arttırdığını, NaHS ile tedavinin ise bu

modellenmeyi azalttığını ileri sürmüşlerdir (W. Li ve diğerleri, 2009). Hipoksi koşullarında NaHS tedavisi sıçanlarda PAB'ı düşürmekte ayrıca pulmoner arter düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir (R. Wang, 2012). Bronşiyal karsinomlu hastalardan alınan pulmoner arterler ile yapılan bir çalışmada H₂S'in güçlü bir vazodilatör olduğu, endotelden bağımsız ve doza bağımlı olarak PAB'da azalma sağladığı gösterilmiştir (Ariyaratnam ve diğerleri, 2013). Tüm bu araştırmalar PH'de H₂S'in potansiyel bir tedavi olabileceğini ortaya koymaktadır.

1.6. Monokrotalin ile İndüklenen Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Modeli

Monokrotalin (MCT), *Crotalaria spectabilis* bitkisinden elde edilen bir pirolizidin alkaloiddir (Gomez-Arroyo ve diğerleri, 2011; Marsboom ve Janssens, 2004; Wilson ve diğerleri, 1992). MCT molekülü asıl etkisini karaciğerde sitokrom P-450 3A (CYP3A4) enzimi ile dehidrojenasyon sonucu oluşan monokrotalin pirol (MCTP) aktif metaboliti ile göstermektedir (Campian, Hardziyenka, Michel ve Tan, 2006; Gomez-Arroyo ve diğerleri, 2011; Wilson ve diğerleri, 1992). MCT, pulmoner damarlarda seçici bir toksisiteye sahiptir ve sistemik damarlar üzerine bir etkisi gözlenmez (Marsboom ve Janssens, 2004). MCTP eritrositlerde birikerek kan yoluyla akciğere taşınır ve pulmoner damarların endotel tabakasında disfonksiyona neden olur (Wilson ve diğerleri, 1992). MCT uygulanan sıçanlarda pulmoner damarlarda medya tabakasında hipertrofi ve mononükleer hücre infiltrasyonu meydana gelir. MCT maruziyetinden 3-4 hafta sonra PAB'da, pulmoner arterlerin medya tabakasının kalınlığında ve sağ ventrikül hipertrofisinde artış gözlenmektedir (Gomez-Arroyo ve diğerleri, 2011). MCT modeli 1961 yılında tanımlanan ve günümüzde de sıklıkla tercih edilen bir PAH modelidir. Modelin tek bir enjeksiyonla oluşturulabilmesi, teknik olarak özel bir yetenek gerektirmemesi ve insan PAH'ını hemodinamik ve histopatolojik olarak iyi yansıtması modelin bu kadar fazla tercih edilmesini açıklamaktadır (Nogueira-Ferreira ve diğerleri, 2015). Pulmoner endotel hücrelerde hasara yol açtığı bilinmesine rağmen hala tüm toksikolojik mekanizması aydınlatılamamıştır (Campian ve diğerleri, 2006; Gomez-Arroyo ve diğerleri, 2011; Nogueira-Ferreira ve diğerleri, 2015).

Gereç ve Yöntem

2.1. Deneyde Kullanılan Hayvanlar

Çalışmalarda 250-300 g ağırlığında yetişkin erkek Wistar sıçanlar; kontrol grubu, MCT grubu, MCT+Na₂S grubu ve Na₂S grubu olmak üzere dört gruba ayrıldılar. Sıçanlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsünde 20-24 °C sıcaklıktaki havalandırılmalı odalarda barındırıldı ve ad libitum beslenmeleri sağlandı. Tez süresince yapılan tüm deneyler Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı alındıktan sonra Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Deneylerde kullanılan cihazlar ve kimyasal maddeler sırasıyla tablo 2 ve 3'te özetlenmektedir.

Tablo 2: Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihaz	Üretici Firma / Ülke
Analitik Terazi AS 220 R2 (220g/0.0001 g)	Radwag / Polonya
Hassas Terazi L4202i (4200g/0.01 g)	Bel Engineering / İtalya
Santrifüj - Universal 320R	Hettich Lab Technology / USA
Su Banyosu	Memmert / Almanya
Sonikatör – Ultrasonic LC 30 H	Elma / Almanya
pH indikatör strip (0-14)	Merck / Almanya
İzole Organ Banyosu Sistemi	Danish Myograph / Danimarka
Powerlab 8/30	AD Instruments / Avustralya
Powerlab Octal Bridge Amp	AD Instruments / Avustralya
Reusable BP Transducer	AD Instruments / Avustralya
Homojenizatör - Retsch CryoMill	Retsch / Almanya
Spektrofotometre – Varioskan Flash	Thermo Fischer Scientific / Finlandiya

Tablo 3: Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan Kimyasal Madde	Üretici Firma / Ülke
Crotaline	Sigma
Na ₂ S	Sigma
Heparin (Nevparin® 25.000IU/5ml)	Mustafa Nevzat İlaç / İstanbul
Ketamin (Alfamine® % 10)	Alfasan / Hollanda
Ksilazin (Alfazyne® % 2)	Alfasan / Hollanda
KCl	Riedel de Haen
NaCl	AppliChem
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
NaHCO ₃	Riedel de Haen
D-(+)-glukoz monohidrat	Sigma
Fenilefrin	Sigma
Asetilkolin	Sigma
L-sistein	Sigma
AOAA (Aminooksi asetik asit)	Sigma
Aprotinin	Cayman
Pepstatin	Bioshop
Leupeptin	Cayman
PMSF (Fenilmetilsülfonil florür)	Sigma
Na ₃ VO ₄	Sigma
NaF	Sigma
Pridoksal 5' fosfat (PLP)	Sigma
ZnAc	Sigma
TCA (Trikloroasetik asit)	Sigma
DPD (N, N-Dietil- <i>p</i> -fenilendiamin)	Sigma
FeCl ₃	Sigma
BCA Protein Miktar Tayini Kiti	Bio Vision / USA

2.2. Deneyde Kullanılan İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması

2.2.1. *İn-vivo* Kullanılan İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması

Monokrotalin çözeltisi: Monokrotalin enjeksiyonu yapılacak hayvanların tartımı alındıktan sonra 60 mg/kg dozda uygulama yapılabilmesi için gerekli MCT miktarı mg cinsinden hesaplandı. Bazik bir molekül olan monokrotalinin Pubchem'de bildirilen çözünürlüğüne (zayıf çözünürlük % 1.2/su) bakılarak, salinde çözündürülen MCT çözeltisinin pH'sı HCl (1 N) ile pH 7.4'e ayarlandı (H. Zhang ve diğerleri, 2019) ve 10 dakika sonikatöre konuldu. Ardından mikropartikül boyutu Malvern Mastersizer 3000 hydro cihazı (boyut aralığı: 0.01-3500 μ M) ile ölçülerek 2.806 μ M olarak bulundu. Literatüre göre i.p. uygulamalarda olması gereken güvenli partikül boyutu yaklaşık <75 μ M olduğundan, hazırlanan süspansiyon güvenle kullanıldı (Shekunov, Chattopadhyay, Tong ve Chow, 2007).

Na₂S çözeltisi: Günlük olarak yapılan tartım kayıtlarındaki hayvan ağırlığı için gerekli olan Na₂S çözelti hacmi hesaplandıktan sonra hayvan başına 2.5 mg/kg/gün konsantrasyonda olacak şekilde %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi içinde çözülerek taze hazırlandı.

Ketamin/Ksilazin: Basınç ölçümü yapılacak hayvanın tartımı alındıktan sonra kilosuna uygun şekilde 60 mg/kg ketamin-5 mg/kg ksilazin gereken hacimlerde ana stoklardan çekilerek anestezi hazırlanmıştır.

2.2.2. İzole Organ Banyosunda Kullanılan İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması

Potasyum Klorür: Stok çözeltisi (2 M) krebste çözülerek taze hazırlanmıştır.

Asetilkolin: Stok çözelti (10^{-1} M) distile su ile taze hazırlanmış, ileri seyreltmeler %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile yapılmıştır.

Fenilefrin: Stok çözelti (10^{-1} M) distile su ile taze hazırlanmış, ileri seyreltmeler %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile yapılmıştır.

L-sistein: Stok çözelti ($5 \cdot 10^{-1}$ M), %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile taze hazırlanmış, ileri seyreltmeler %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile yapılmıştır.

Na₂S: Stok çözelti ($7 \cdot 10^{-1}$ M), %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile taze hazırlanmış, ileri seyreltmeler %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile yapılmıştır.

AOAA: Stok çözelti (10^{-1} M) krebsste çözülerek taze hazırlanmıştır.

2.2.3. Krebs Çözeltisinin Hazırlanması

2.2.3.1. Konsantre Krebs (x20) Hazırlanması

Tablo 4'te verilen maddeler uygun miktarlarda hassas terazide tartılarak önce bir miktar distile su içerisinde çözündürüldükten sonra distile su ile hacim 2 litreye tamamlandı.

Tablo 4: Konsantre Krebs Hazırlamada Kullanılan Maddeler

Madde	Miktar (g)
KCl	14
MgSO ₄ .7H ₂ O	11.9
KH ₂ PO ₄	6.4
CaCl ₂ .2H ₂ O	14.8
NaCl	276

2.2.3.2. Normal Krebs Hazırlanması

Konsantre krebs çözeltisinin 50 ml'si bir miktar distile su içerisine alındı. Ardından tablo 5'te verilen maddeler hassas terazide tartılarak üzerine eklendi ve distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

Tablo 5: Normal Krebs Hazırlamada Kullanılan Maddeler

Madde	Miktar (g)
NaHCO ₃	2.1
D-(+)-glukoz monohidrat	2

2.3. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Modelinin Oluşturulması

Sıçanlarda PAH oluşturmak için 60 mg/kg MCT tek doz intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi (Feng ve diğerleri, 2017; J. M. Kay, Smith, Heath ve Will, 1976; J. Michael Kay, 2017; Nogueira-Ferreira ve diğerleri, 2015). Kontrol ve MCT gruplarına fizyolojik salin çözeltilisi, MCT+Na₂S ve Na₂S gruplarına ise Na₂S (2.5 mg/kg/gün) çözeltilisinin i.p. enjeksiyonu yapıldı. MCT modelinde 21 günlük bekleme periyodunun ardından PAH oluşumu gerçekteştiği bilinmektedir (Lai, Olson ve Gillespie, 2017; Nakazawa, Hori, Ozaki ve Karaki, 1999). Bu nedenle sıçanlarda basınç ölçümü ve izole organ banyosu deneyleri için 21 gün beklenmiştir. Çalışmada kontrol ve Na₂S grubu için 8'er ve MCT ve MCT+ Na₂S grubu için 10 hayvan olmak üzere toplam 36 adet sıçan kullanılmış ve sıçanlar 4 gruba ayrılmışlardır.

Grup 1; 21 gün i.p. fizyolojik salin çözeltilisi enjeksiyonu yapılan kontrol sıçanlar (K)

Grup 2; MCT ile PAH geliştirilen 21 gün i.p. fizyolojik salin çözeltilisi enjeksiyonu yapılan sıçanlar (MCT)

Grup 3; MCT ile PAH geliştirilen 21 gün i.p. Na₂S enjeksiyonu ile tedavi edilen sıçanlar (MCT+Na₂S)

Grup 4; 21 gün i.p. Na₂S enjeksiyonu yapılan sıçanlar (Na₂S)

2.4. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda Na₂S Tedavisi

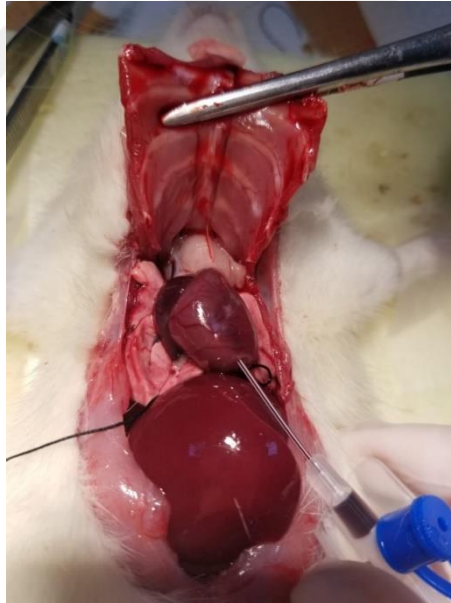
MCT+Na₂S ve Na₂S gruplarına tedavi için MCT enjeksiyonundan itibaren 21 gün boyunca her gün 2.5 mg/kg/gün olacak şekilde i.p. enjeksiyon yapıldı. Kontrol grubuna ise 21 gün boyunca intraperitoneal fizyolojik salin çözeltilisi enjeksiyonu yapıldı.

Çalışmamızda kullandığımız Na₂S dozu, bronşiyal karsinomalı hastalardan alınan pulmoner arter ringlerinde gevşetici etkiyi ve aynı hastalardan alınan izole perfüze akciğer lobunda arteriyel basınçta anlamlı azalma sağlayıcı etkiyi oluşturan ve ayrıca tedavi edici etkinlik için dolaşımda H₂S konsantrasyon aralığının 50-500 µM olması gerektiğini bildirilen çalışma esas alınarak hesaplanmıştır (Ariyaratnam ve diğerleri, 2013). Bunun yanında, literatürde MCT ile indüklenmiş PH oluşturulan erkek Wistar sıçanlarda kan basıncında istatistiksel olarak anlamlı düşüş sağlayan NaHS dozu (56 mikromol/kg) dikkate alınarak ve Na₂S'in daha saf olduğu göz önünde bulundurularak

uygulamış olduğumuz H₂S donörü için kullanılacak dozun hesabı yapılmıştır (Feng ve diğerleri, 2017).

2.5. Sağ Ventrikül Basıncının Ölçülmesi

Tüm gruplara çalışmanın 22. gününde, 60 mg/kg ketamin-5 mg/kg ksilazin karışımı aracılığıyla anestezi uygulandı. Anestezinin derinliği çimdikleme refleksi ve korneal refleks ile kontrol edildi. PAB'ı doğrudan ölçmek mümkün olmadığı ve sağ ventrikül basıncının PAB'a eşdeğer olduğu gösterildiği için basınç ölçümü sağ ventrikül kateterizasyonu ile yapıldı (J. M. Kay, Crawford ve Heath, 1967). Ksifoidin altından bir insizyon yapılarak cilt iki yana kesildi, ardından abdominal duvar kesilerek karın boşluğu diyafram boyunca açıldı. İnferior vena cava ipek iplik ile bağlandı. Ucunda bir kateter bulunan 23-gauge iğne yardımıyla sağ ventriküle girilerek katater burada bırakıldı (Resim 1) ve bir basınç transduser aracılığıyla doğrudan sağ ventriküldeki basınç veri kayıt sistemine aktarıldı (Ma, Mao ve Rajagopal, 2016) (Resim 2 ve 3).



Resim 1: Kateter ile Sağ Ventrikül Basıncının Ölçümü



Resim 2: Kan Basıncı Transduseri (dönüştürücüsü)



Resim 3: Basıncı Kayıt Sistemi (Powerlab Veri Kayıt Sistemi)

2.6. Sağ Ventrikül Hipertrofinin Ölçülmesi

Pulmoner hipertansiyonlu hayvanlarda kalpte sağ ventrikül hipertrofinin belirlenebilmesi için sağ ventrikül, sol ventrikül ve septal duvardan ayrıldı. Daha sonra oranlama yapabilmek için sağ ventrikül ve kalbin kalanı (sol ventrikül ve septum) ayrı ayrı tartılarak birbirine oranlandı. Sağ ventrikül hipertrofi: [(sağ ventrikül/(sol ventrikül+septum)].

2.7. İzole Organ Banyosu Deneyleri

Sıçanlarda sağ ventrikül basıncı ölçümünün ardından, yüksek doz anestezi ile hayvan ötenazi edildi, sonra kalp ve akciğerleri hızla soğuk Krebs çözeltilisi (NaCl [119 mM], KCl [4.7 mM], CaCl₂ [2.5 mM], MgSO₄.7H₂O [1.2 mM] KH₂PO₄ [1.2 mM], NaHCO₃ [25 mM], D- glukoz [11 mM], pH 7.4) içine alınarak ve ana pulmoner arter ile sağ ve sol olmak üzere yan dallar da akciğerden temizlenerek çıkarıldı (Resim 3). Kalp, akciğer dokusu, sağ pulmoner arter, sol pulmoner arter ve ana pulmonerlerden organ banyosu deneyinde kullanılmayan arterler H₂S ölçümleri yapılabildiği kadar -80 °C'ye kaldırıldı. İzole edilen ana pulmoner arterler 37 °C'de %95 O₂ - %5 CO₂ karışımıyla sürekli olarak gazlandırılan, pH'sı 7.4 olan Krebs solüsyonu içeren DMT marka miyografın (Danish Myograph, Danimarka) 5 ml'lik banyolarına endotel tabakasına zarar vermeden asıldı (Resim 4 ve 5). Ana pulmoner arterlere izometrik olarak 10 mN öngerilim uygulandı. Ardından dokular 15 dakikalık aralıklarla Krebs solüsyonu ile yıkanarak 90 dakika dinlenme periyoduna bırakıldı. İzometrik gerilimdeki değişiklikler Powerlab kayıt sistemi ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Dokuların canlılığını tespit edebilmek ve endotele bağlı gevşeme cevaplarını araştırmak amacıyla dokular önce 60 mM KCl ile kastırıldı ve ardından tek doz 10⁻⁵ M asetilkoline (ACh) karşı gevşeme yanıtı alındı. Ardından 10⁻⁶ M fenilefrin (Fen) ile kastırıldı ve 10⁻⁹-10⁻⁵ M asetilkolin ile kümülatif olarak gevşeme yanıtı alındı. %40'tan fazla gevşeme alınan dokular sağlıklı kabul edildi. İzole organ banyosuna asılan ana pulmoner arter ring preparatlarında ise aşağıdaki protokol uygulandı. Endojen H₂S üretiminin rolünü incelemek için kümülatif dozlarda H₂S öncülü L-sistein, eksojen H₂S'in etkisini görmek ve H₂S'in downstream mekanizmalarının rolünü incelemek için ise H₂S dönörü olarak Na₂S verilerek bu ajanlara karşı gelişen konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtları değerlendirildi. Deneylerde ayrıca endojen H₂S'in rolünü araştırmak için L-sistein doz yanıt eğrileri H₂S sentez inhibitörü AOAA (amino-oksiasetat) varlığında ve yokluğunda tekrarlandı. İzole organ banyosunda kullanılan L-sistein kümülatif gevşeme konsantrasyon aralığı, kontrol sıçanların pulmoner arterleri ile ön çalışmalardan elde ettiğimiz gevşeme yanıtlarına göre belirlendi. Ön çalışmalarımızda kümülatif olarak 10⁻⁵ - 3.10⁻² M aralığında L-sistein ile multifazik yanıtlar (kasılma-gevşeme-kasılma) alındığından, bu yanıt eğrilerinden L-sistein'in sadece gevşeme yanıtı oluşturduğu doz aralığı seçilerek çalışmada L-sistein doz aralığı 10⁻⁴ - 2.10⁻³ M

2.8. Doku Homojenizasyonu

Ana, sağ, sol pulmoner arterler ve akciğer dokuları homojenizasyondan önce hassas terazide tartıldı. Homojenizasyon tamponu pH'sı 7.4 olan fosfat tamponunun (0.1 M K_2HPO_4 çözeltisinin pH'ı 0.1 M KH_2PO_4 ile ayarlandı) içerisine proteaz (10 mg/ml aprotinin, 10^{-3} mM pepstatin, 0.02 mM leupeptin, 0.5 mM PMSF) ve fosfataz inhibitörleri (0.2 mM Na_3VO_4 , 0.05 mM NaF) eklenerek hazırlandı. Dokular homojenizasyon tamponu ile sıvı azot altında cryomill (Retsch, CryoMill) cihazında toz haline getirildi (Resim 6). Ependorfta bulunan doku miktarına göre hesaplanan hacimde (doku miktarının 15 katı olacak şekilde) homojenizasyon tamponu (μ l) dokulara eklendi. Dokular $+4^\circ C$ 'de 60 dakika rotörde çevrildi. Ardından dokular tekrar cryomill cihazında homojenize edildi. Homojenatlara ependorftaki doku miktarının 15 katı hacimde homojenizasyon tamponu eklendi. Homojenatlar $+4^\circ C$ 'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi (Resim 7) ve süpernatant kısmı alınarak homojenat elde edildi. Homojenatlar protein miktar tayini (BCA) ve hidrojen sülfür düzeylerinin ölçülmesi (metilen mavisi deneyi) için $-86^\circ C$ 'de saklandı.



Resim 6: Homojenizatör (Retsch, CryoMill)



Resim 7: Soğutmalı Santrifüj (Hettich Lab Technology)

2.9. Total Protein Hesaplama

H₂S düzeyleri ölçülecek doku homojenatlarındaki protein miktarları, bikinkoninik asit analizi (BCA) ile belirlenmiştir. Bu analiz için BCA protein kiti (Bio Vision) kullanılmıştır. BCA analizinin prensibi, alkali ortamda proteinlerin Cu²⁺'yi Cu⁺'e indirgemesi ve oluşan BCA-bakır kompleksinin mor renk vermesine dayanmaktadır. Bu mor renk 562 nm'de spektrofotometrede ölçülür.

BCA kitindeki standart (10 mg/ml) 1:2 oranında ultra saf distile su ile seyreltilerek 500 - 250 - 125 - 62.5 - 32.25 µg konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı.

BCA kit çözeltisinin hacmi kullanılan her mikrolaka kuyucuğa 100 µl eklenecek şekilde hesaplandı. Toplam hacimde 50 birim BCA reaktifi, 1 birim bakır reaktifinden olacak şekilde BCA kit çözeltisi hazırlandı.

Homojenatlar ultra saf distile su ile 1:20 oranında seyreltildi. Homojenatlardan ve standartlardan 50 µl olacak şekilde mikrolaka kuyucuklarına yüklendikten sonra BCA kit çözeltisinden 100 µl hem homojenatların hem de standartların olduğu kuyucuklara eklendi. Mikrolaka sıkıca parafilmlelendikten sonra alüminyum folyoya sarılı şekilde 60°C su banyosunda 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından mikrolaka çok modlu plak okuyucuda (Varioscan, Thermo Scientific - Finlandiya) 562 nm'de okutuldu (Resim 8). Homojenatların protein miktarları hesaplandıktan sonra metilen mavisi deneyinde kullanılmak üzere -86°C'de saklandı.



Resim 8: Varioscan Çok Modlu Plak Okuyucu (Thermo Scientific)

2.10. H₂S Düzeylerinin Ölçülmesi

Metilen mavisi yöntemiyle dokulardaki hidrojen sülfür düzeyleri ölçüldü.

250 - 125 - 62.5 - 31.25 - 15.6 - 7.8 - 3.9 μ M konsantrasyonlarında olacak şekilde Na₂S tartımı alınıp pH 7.4 fosfat tamponunda çözülerek ve seyreltilerek standartlar hazırlandı.

BCA kiti ile yapılan protein analizinin sonuçlarına göre 25 μ g protein içeren homojenat hacmi hesaplandı. Ardından homojenatların üzerine toplam hacim 250 μ l olacak şekilde; fizyolojik tuz çözeltisi (% 0.9, 15 μ l), pridoksal 5' fosfat (2 mM, 50 μ l), L-sistein (10 mM, 5 μ l) eklendi ve eksik kalan miktar pH 7.4 fosfat tamponu ile tamamlandı. Örnekler 30 dakika 37°C'de bekletildikten sonra tüm örnekler, standartlar ve kör için aşağıdaki reaktifler sırasıyla eklendi:

1. 125 μ l %1 ZnAc eklenir ve yavaşça sallanır.
2. 125 μ l %10 TCA eklenir.
3. 66.5 μ l DPD eklenir, hızlı ve dik biçimde sallanır.
4. 66.5 μ l FeCl₃ eklenir.

15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilir. Ardından +4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Tüm örnekler, standartlar ve kör mikropalakaya 200 μ l olacak

şekilde pipetlendi. Ardından mikrolaka çok modlu plak okuyucuda 650 nm'de okutuldu ve 10. dakikada okutulan değerler alındı. Absorbans ölçümünden sonra analiz yapılarak her örnek için hidrojen sülfür konsantrasyonu hesaplandı.

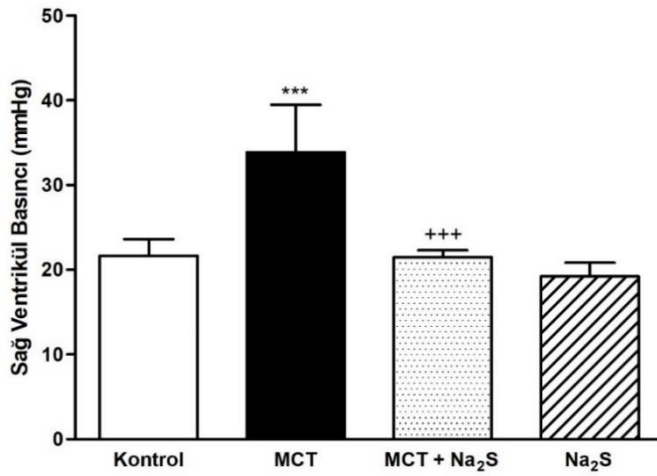
2.11. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmadaki tüm veriler ortalama \pm SEM olacak şekilde verilmiştir. Gevşeme yanıtları ön kastırıcıyla oluşturulan maksimum yanıtının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Kasılma ve gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesinde LabChart 7.0 yazılımı kullanılmıştır (LabChart Software, San Diego, CA, ABD). İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. E_{maks} ve PD_2 değerleri karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ardından Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmış ve $P < 0.05$ istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir. Vasküler yanıtlarının konsantrasyon düzeyinde karşılaştırmalarında ise çift yönlü ANOVA uygulanmıştır. N, çalışmada kullanılan hayvan sayısını göstermektedir.

Bulgular

3.1. MCT Uygulaması ve Na₂S Tedavisinin Sıçan Sağ Ventrikül Basıncı Üzerine Etkisi

Sağ ventrikül basıncı, kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. MCT+Na₂S grubunda ise bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Kontrol grubu ile Na₂S tedavisi alan gruplar (MCT+Na₂S ve Na₂S) arasında pulmoner arter basıncı açısından istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (Şekil 1).

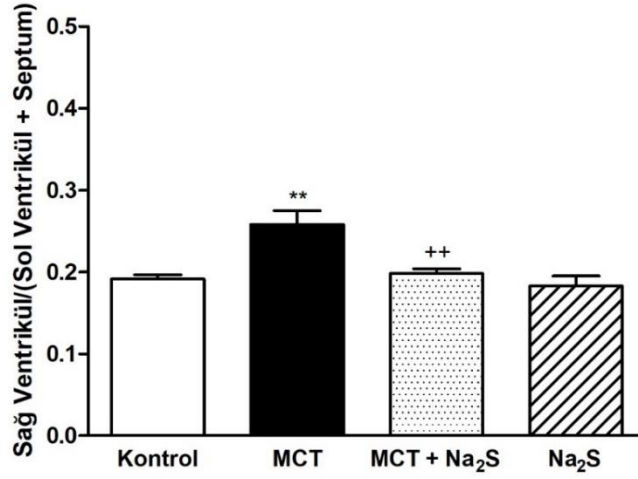


Şekil 1: Sıçanlardaki Sağ Ventrikül Basıncıları

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** $P < 0.001$, Kontrol ile MCT; +++ $P < 0.001$, MCT ile MCT+Na₂S, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), MCT (n=10), MCT+Na₂S (n=10), Na₂S (n=6).

3.2. MCT Uygulaması ve Na₂S Tedavisinin Sıçan Sağ Ventrikül Hipertrofisi Üzerine Etkisi

[Sağ ventrikül/(sol ventrikül+septum)] ağırlık oranları MCT grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. MCT+Na₂S grubunda ise bu oran MCT grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Kontrol ile Na₂S tedavisi alan gruplar (MCT+Na₂S ve Na₂S) arasında istatistiksel olarak bir anlamlı bir fark yoktur (Şekil 2).



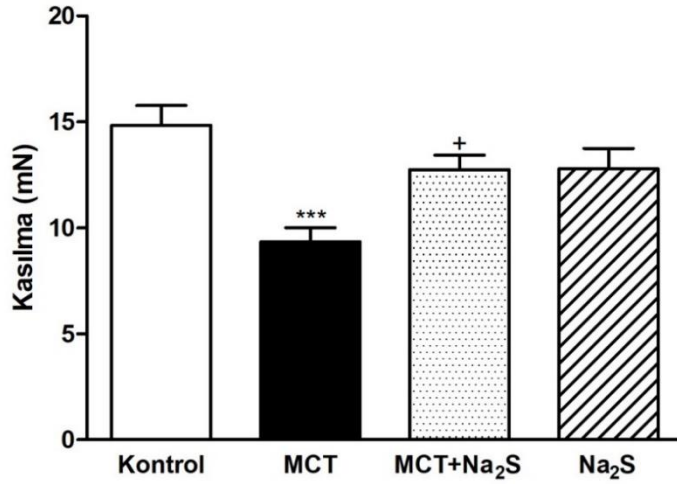
Şekil 2: Sıçanlarda Sağ Ventrikül Hipertrofisi

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ** $P < 0.01$, Kontrol ile MCT; ++ $P < 0.01$, MCT ile MCT+Na₂S, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), MCT (n=10), MCT+Na₂S (n=10), Na₂S (n=7).

3.3. İzole Organ Banyosunda Sıçan Ana Pulmoner Arter Yanıtları

3.3.1. Potasyum Klorür (KCl) Yanıtları

60 mM KCl kasılma yanıtları kontrol grubuyla kıyaslandığında, MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Kasılmadaki bu azalma MCT+Na₂S grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde geriye dönerek normalize olmuştur. Kontrol grubu ile Na₂S tedavisi alan gruplar (MCT+Na₂S ve Na₂S) arasında KCl kasılmaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 3).

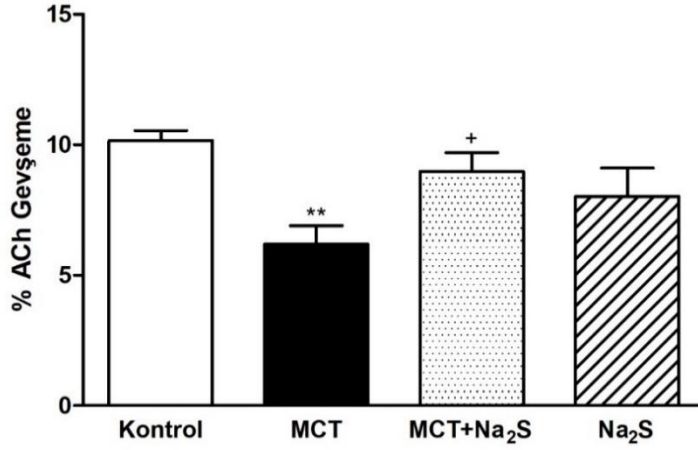


Şekil 3: Sıçan Ana Pulmoner Arterinde 60 mM KCl Kasılma Yanıtları

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** $P < 0.001$, Kontrol ile MCT, + $P < 0.05$, MCT ile MCT+Na₂S Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), MCT (n=10), MCT+Na₂S (n=10), Na₂S (n=7).

3.3.2. KCl Sonrası Tek Doz (10^{-5} M) ACh Gevşeme Yanıtları

60 mM KCl kasılma yanıtları sonrası tek doz uygulanan ACh gevşemesi, MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış buna karşın MCT+Na₂S grubunda ise bu gevşemenin anlamlı düzeyde artarak normalize olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu ile Na₂S tedavisi alan gruplar (MCT+Na₂S ve Na₂S) arasında KCl sonrası ACh gevşeme yanıtları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Şekil 4).

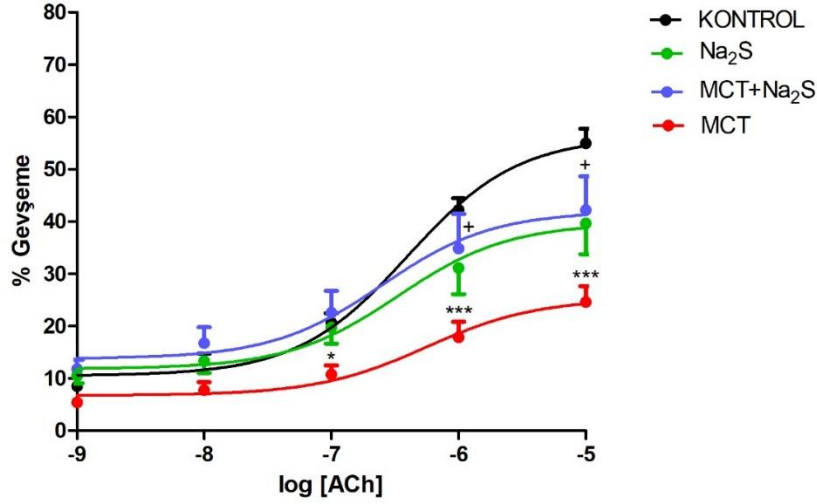


Şekil 4: Sıçan Ana Pulmoner Arterinde 60 mM KCl Sonrası Tek Doz (10^{-5} M) ACh Gevşeme Yanıtları

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $**P < 0.01$, Kontrol ile MCT; $+P < 0.05$, MCT ile MCT+Na₂S, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), MCT (n=10), MCT+Na₂S (n=10), Na₂S (n=6).

3.4. Fenilefrin Ön kastırma Sonrası Kümülatif Asetilkolin Gevşeme Yanıtları

Sıçan ana pulmoner arterinde tek doz 10^{-6} M fenilefrin ön kastırması sonrası kümülatif 10^{-9} - 10^{-5} M ACh gevşeme yanıtları alınmıştır. Fenilefrin ön kastırmaların gruplar arası karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Veri gösterilmemiştir). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MCT grubunda maksimum ACh gevşeme yanıtları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu azalma 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M dozlarında görülmektedir. MCT+Na₂S grubunda ise gevşemedeki bu azalma geriye çevrilmiş, 10^{-6} ve 10^{-5} M dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5). ACh duyarlılığı açısından değerlendirildiğinde gruplar arası pD₂ karşılaştırmalarında istatistiksel herhangi bir anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 6).



Şekil 5: Sıçan Ana Pulmoner Arterinde Fenilefrin Ön kastırma (10⁻⁶ M) Sonrası Kümülatif Asetilkolin Gevşeme Yanıtları

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** $P<0.001$, * $P<0.05$, Kontrol ile MCT; + $P<0.05$, MCT ile MCT+Na₂S, İki Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), Na₂S (n=8), MCT+Na₂S (n=9), MCT (n=9).

Tablo 6: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Asetilkolin Duyarlılığı.

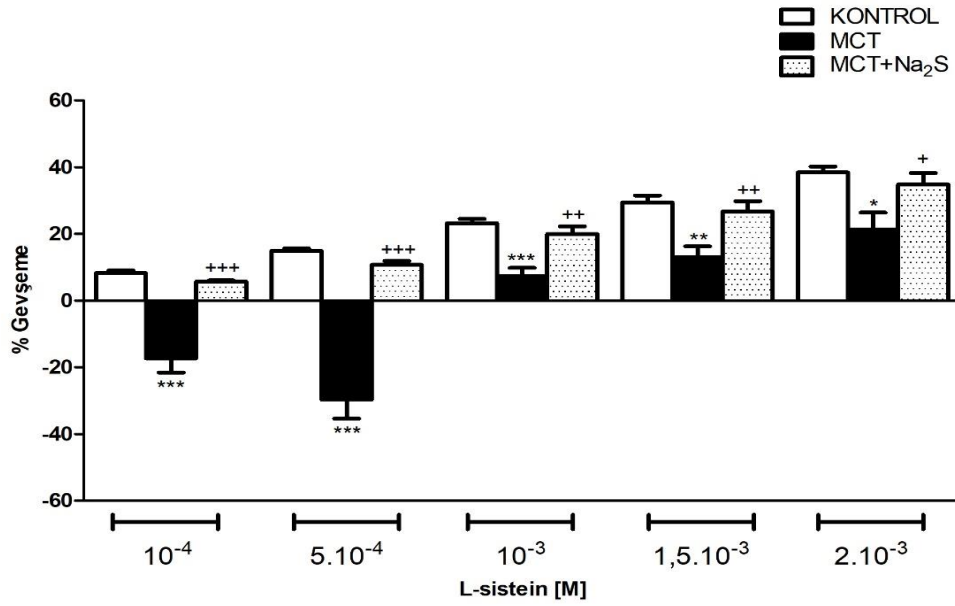
Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Tek Yönlü ANOVA Testi – Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi.

ACh	pD ₂ \pm SEM
Kontrol	6.43 \pm 0.09
MCT	6.29 \pm 0.21
MCT+Na ₂ S	6.53 \pm 0.13
Na ₂ S	6.67 \pm 0.28

3.5. Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif L-sistein Yanıtları

Sıçan ana pulmoner arterinde daha önce bildirdiğimiz gibi kontrol hayvanlarda ön denemeler ile belirlediğimiz L-sisteinin gevşeme oluşturduğu konsantrasyon aralığı açılarak, 10⁻⁶ M fenilefrin ön kastırması sonrası 10⁻⁴-2.10⁻³ M aralığında L-sistein yanıtları alınmıştır. Bu aralıkta tüm konsantrasyonlarda kontrol grubunda gevşeme yanıtı gözlenirken, MCT grubunda bu gevşemeler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

inhibe olmuştur. Hatta 10^{-4} ve 5.10^{-4} M konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda kasılma gözlenmiştir. MCT grubunda 10^{-4} ve 5.10^{-4} M konsantrasyondaki kasılma yanıtları, MCT+Na₂S grubunda (yani Na₂S tedavisi varlığında) gevşeme yanıtına dönüşmüştür ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. 10^{-3} - 2.10^{-3} M konsantrasyonları arasında MCT grubuyla kıyaslandığında MCT+Na₂S grubunda her konsantrasyonda gevşeme yanıtları istatistiksel anlamlı düzeyde artmıştır (Şekil 6). PAH ve Na₂S tedavisinin sıçan ana pulmoner arterlerinde L-sistein duyarlılığı üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamıştır (Tablo 7).



Şekil 6: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif L-sistein Yanıtları (Kontrol, MCT ve MCT+Na₂S)

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05, Kontrol ile MCT; +++ P <0.001, ++ P <0.01, + P <0.05, MCT ile MCT+Na₂S, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=7), MCT (n=7), MCT+Na₂S (n=9).

Tablo 7: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası L-sistein Duyarlılığı.

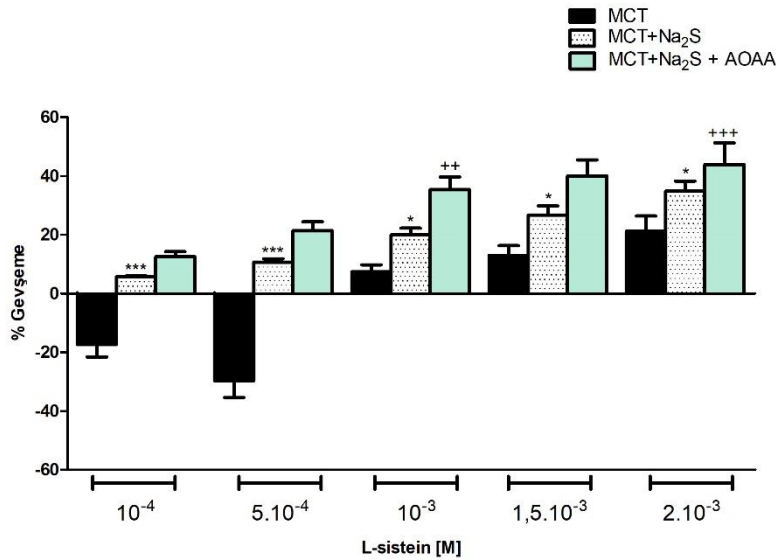
Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi.

L-sistein	$pD_2 \pm SEM$
Kontrol	2.38 \pm 0.09
MCT	2.47 \pm 0.21
MCT+Na ₂ S	2.37 \pm 0.13

3.6. AOAA (2 mM) varlığında Fenilefrin

Ön Kastırma Sonrası L-sistein Yanıtları

Sıçan ana pulmoner arterinde 30 dk, 2 mM AOAA inkübasyonunun ardından 10^{-6} M fenilefrin ön kastırması sonrası 10^{-4} - $2 \cdot 10^{-3}$ M aralığında L-sistein yanıtları alınmıştır. 10^{-4} ve $5 \cdot 10^{-4}$ M L-sistein konsantrasyonlarında, MCT grubunda kasılma gözlenirken, MCT+Na₂S grubunda gevşeme gözlenmiştir ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. 10^{-3} ve $1,5 \cdot 10^{-3}$ M L-sistein yanıtlarında MCT grubuna kıyasla MCT+Na₂S grubunda gevşeme yanıtları anlamlı olarak artmıştır. 10^{-3} ve $2 \cdot 10^{-3}$ M L-sistein yanıtlarında MCT+Na₂S grubuna kıyasla MCT+Na₂S+AOAA grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış görülmektedir (Şekil 7).

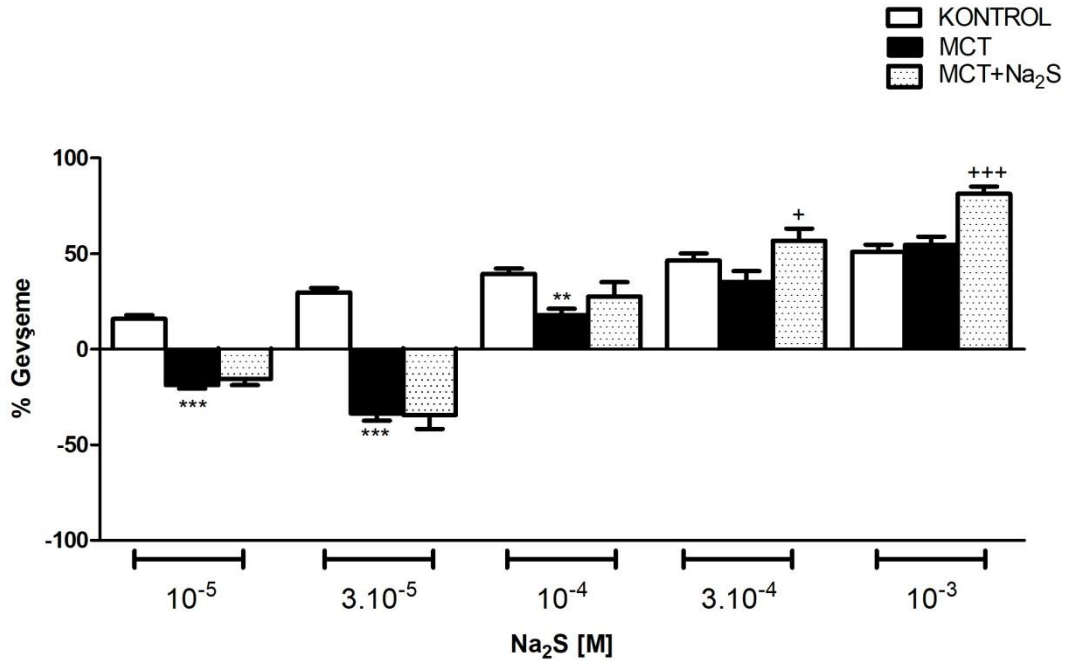


Şekil 7: 2 mM AOAA İnkübasyonlu Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif L-sistein Yanıtları (MCT, MCT+Na₂S ve MCT+Na₂S+AOAA)

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** P <0.001, * P <0.05, MCT ile MCT+Na₂S; +++ P <0.001, ++ P <0.01, MCT+Na₂S ile MCT+Na₂S+AOAA, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. MCT (n=7), MCT+Na₂S (n=9), MCT+Na₂S+AOAA (n=6).

3.7. Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif Na₂S Yanıtları

Sıçan ana pulmoner arterinde 10⁻⁶ M fenilefrin ön kastırması sonrası kümülatif 10⁻⁵-10⁻³ M Na₂S gevşeme yanıtları alınmıştır. 10⁻⁵ ve 3.10⁻⁵ M dozlarda kontrol grubunda gevşeme yanıtları; MCT grubunda ise kasılma yanıtları gözlenmiştir ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. 10⁻⁴ M dozda Na₂S gevşeme yanıtı kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. 3.10⁻⁴ ve 10⁻³ M dozlarda MCT grubuna kıyasla MCT+Na₂S grubundaki gevşeme yanıtı istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 8). MCT uygulanan hayvanlarda sıçan pulmoner arterlerinde kümülatif Na₂S yanıtlarına karşı duyarlılık artmıştır (Tablo 8).



Şekil 8: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Kümülatif Na₂S Yanıtları (Kontrol, MCT ve MCT+Na₂S)

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** P <0.001, ** P <0.01, Kontrol ile MCT; +++ P <0.001, + P <0.05, MCT ile MCT+Na₂S, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), MCT (n=8), MCT+Na₂S (n=7).

Tablo 8: Fenilefrin Ön Kastırma Sonrası Na₂S Duyarlılığı

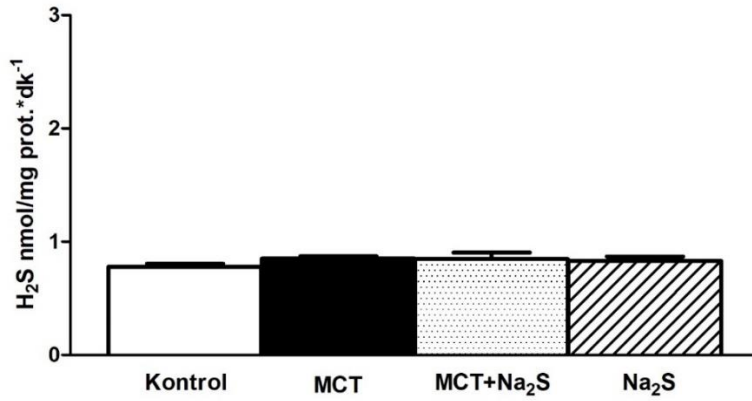
Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ****P<0.01**, Kontrol ile MCT, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi.

Na ₂ S	pD ₂ \pm SEM
Kontrol	4.63 \pm 0.17
MCT	3.83 \pm 0.08**
MCT+Na ₂ S	3.75 \pm 0.10

3.8. MCT Uygulaması ve Na₂S Tedavisinin Sıçan Akciğer ve Pulmoner Arterindeki H₂S Düzeyleri Üzerine Etkisi

3.8.1. Akciğer Dokusunda H₂S Düzeyleri

Akciğer dokusunda bazal H₂S düzeyleri, kontrol grubuyla kıyaslandığında MCT grubu ve Na₂S tedavisi alan gruplar (MCT+Na₂S ve Na₂S) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 9).

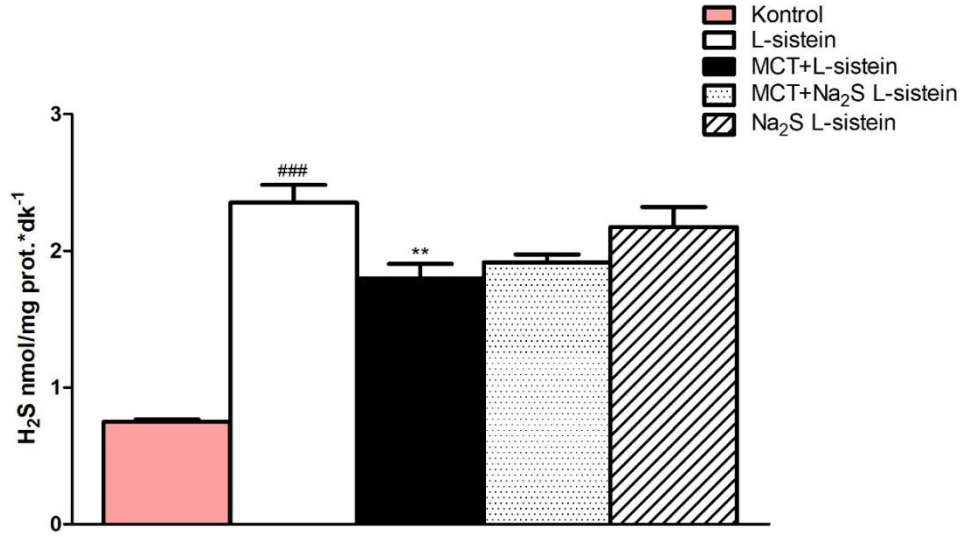


Şekil 9: Akciğer dokusunda bazal H₂S düzeyleri

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), MCT (n=10), MCT+Na₂S (n=10), Na₂S (n=8).

L-sistein inkübasyonu varlığında akciğer dokusundaki H₂S düzeyleri, kontrol grubuna (bazal) kıyasla L-sistein grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. MCT

grubunda ise L-sistein grubuna kıyasla anlamlı bir azalma vardır. MCT grubu ile MCT+Na₂S grubu arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır. L-sisten grubuyla Na₂S tedavisi alan gruplar (MCT+Na₂S ve Na₂S) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 10).

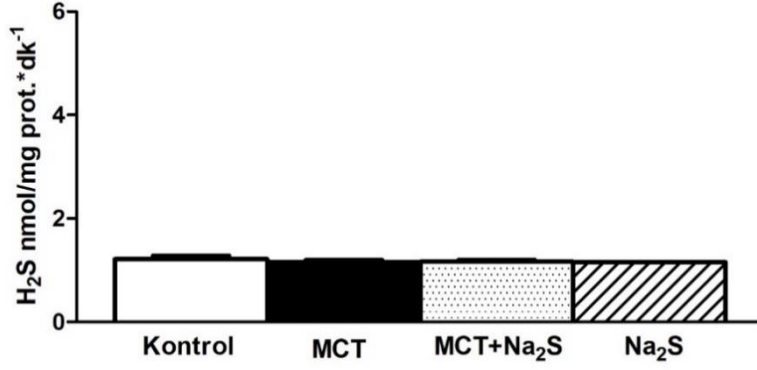


Şekil 10: L-sistein inkübasyonu varlığında akciğer dokusundaki H₂S düzeyleri

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. ### $P < 0.001$, Kontrol (bazal) ile L-sistein, ** $P < 0.01$, L-sistein ile MCT, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), L-sistein (n=8), MCT (n=7), MCT+Na₂S (n=6), Na₂S (n=8).

3.8.2. Pulmoner Arter H₂S Düzeyleri

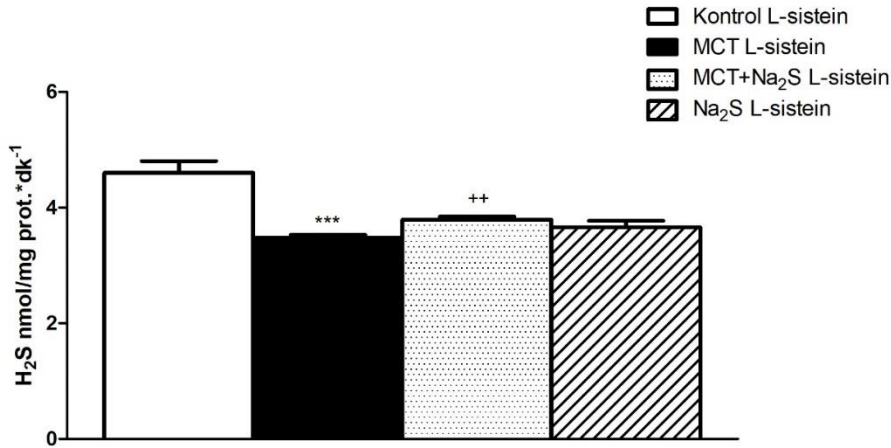
Pulmoner arterlerde bazal H₂S düzeyleri, kontrol (bazal) grubuyla kıyaslandığında MCT grubu ve Na₂S tedavisi alan gruplar (MCT+Na₂S ve Na₂S) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 11).



Şekil 11: Pulmoner arterlerde bazal H₂S düzeyleri

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=8), MCT (n=7), MCT+Na₂S (n=7), Na₂S (n=5).

L-sistein inkübasyonu varlığında pulmoner arterlerdeki H₂S düzeyleri, kontrol (bazal) grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. MCT+Na₂S grubunda ise MCT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Kontrol ile Na₂S tedavisi alan gruplar (MCT+Na₂S ve Na₂S) arasında istatistiksel olarak bir anlamlı bir fark yoktur (Şekil 12).



Şekil 12: L-sistein inkübasyonu varlığında pulmoner arterlerdeki H₂S düzeyleri

Veriler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *** P <0.001, Kontrol ile MCT, ++ P <0.01, MCT ile MCT+Na₂S, Tek Yönlü ANOVA Testi - Bonferroni's Çoklu Karşılaştırma Testi. Kontrol (n=5), MCT (n=6), MCT+Na₂S (n=6), Na₂S (n=6).

Tartışma

Pulmoner arteriyel hipertansiyon, pulmoner arterlerde tromboz, inflamasyon, vasküler yeniden yapılanma ve vazokonstriksiyon mekanizmalarını içeren ilerleyici bir hastalıktır (Nogueira-Ferreira ve diğeri, 2015). Vasküler yapıda meydana gelen bu değişiklikler sonucunda gelişen obstrüksiyon kan akışını kısıtlamakta ve pulmoner arter basıncını arttırmaktadır. Buna bağlı olarak hastalarda saę ventrikül hipertrofisi ve sonuç olarak saę ventrikül yetmezliği gelişmektedir (Sztuka ve Jasińska-Stroschein, 2017).

Monokrotalin (60 mg/kg) ile oluşturulan PAH modeli, deneysel PAH modelleri arasında hem uygulama kolaylığı hem de insan PAH'ını hemodinamik ve histopatolojik açıdan iyi yansıması nedeniyle en çok tercih edilen modeldir (Gomez-Arroyo ve diğeri, 2011; Nogueira-Ferreira ve diğeri, 2015). Endotel disfonksiyonu PAH patogeneziindeki en temel mekanizmadır. Monokrotalinin PAH oluşturma mekanizmasından sorumlu olan aktif metaboliti karaciğerde oluşan MCTP'dir. Bu molekül eritrositlerde birikerek akciğerlere taşınır ve spesifik olarak pulmoner damarların endotel tabakasında disfonksiyona neden olur (Wilson ve diğeri, 1992). Bu nedenlerle çalışmamızda pulmoner arteriyel hipertansiyon oluşturmak için monokrotalin modeli kullanılmıştır.

Günümüzde H₂S'in pek çok hücre ve dokuda sentezlendiği, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda çeşitli hücre fonksiyonlarına aracılık eden bir sinyal molekülü olduğu kabul edilmektedir (Whiteman ve diğeri, 2015). H₂S'in torasik aorta, portal ven ve ileum gibi düz kaslarda gevşetici etkisinin olduğu (Hosoki ve diğeri, 1997), bronşiyal karsinomlu hastalardan alınan izole insan pulmoner arterinde güçlü vazodilatör etki oluşturduğu ve böylelikle pulmoner arter basıncında azalma sağladığı gösterilmiştir (Ariyaratnam ve diğeri, 2013). H₂S'in fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, eksojen H₂S donörü olarak sıklıkla NaHS ya da Na₂S kullanılmaktadır. Her iki ajan da pH bağımlı hızlı ayrışan basit sodyum tuzlarıdır. NaHS'in ticari ürünlerine bakıldığında düşük saflığa sahip olduğu dikkat çekmektedir (\geq % 60 saflık) (Whiteman ve diğeri, 2015). Bu nedenle çalışmamızda PAH tedavisinde H₂S'in rolünü araştırmak üzere eksojen H₂S kaynağı olarak \geq %98 saflıkta Na₂S (Na₂S.9H₂O, sodyum sülfid nonahidrat) tercih edilmiştir.

Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Gelişimi ve Sağ Ventrikül Hipertrofisi

Pulmoner arter basıncını doğrudan ölçme imkanı olmadığından sağ ventrikül basıncının pulmoner arter basıncına eşdeğer olduğu kabul edilmektedir (J. M. Kay ve diğerleri, 1967). Çalışmamızda, sağ ventrikül basıncının kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir, bu sonuç daha önceki çalışmalarda MCT ile indüklenen PAH modelinde gözlenen sağ ventrikül basıncı (Ilgin ve diğerleri, 2012) ve pulmoner arter basıncındaki (Feng ve diğerleri, 2017) artış ile uyumludur. PAH'da [sağ ventrikül/(sol ventrikül+septum)] oranı, sağ ventrikül hipertrofisinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (C. Zhang ve diğerleri, 2003), bu oran çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Aynı zamanda MCT ile indüklenen PAH modelinin oluşturulduğu benzer çalışmalardaki [sağ ventrikül/(sol ventrikül+septum)] oranlarıyla da benzerdir (Feng ve diğerleri, 2017; H. Zhang ve diğerleri, 2019). Bütün bu veriler, sıçanlarda MCT enjeksiyonu ile indüklenen PAH modelinin çalışmamızda başarılı bir biçimde oluşturulduğunu göstermektedir.

MCT grubunda yükselen sağ ventrikül basıncı ve sağ kalp hipertrofisinin göstergesi olarak artan [sağ ventrikül/(sol ventrikül+septum)] oranı, Na₂S ile tedavi ettiğimiz grupta (MCT+Na₂S) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu sonuç, çalışmamızda MCT uygulamasıyla eş zamanlı olarak başlattığımız Na₂S tedavisinin başka bir deyişle eksojen H₂S'in, sıçanlarda hem pulmoner arteriyel basınçtaki yükselmeyi hem de sağ ventrikül hipertrofi oranındaki artışı engelleyerek PAH gelişmesine karşı koruyucu rolü olduğunu göstermektedir. Literatürde çalışmamız ile benzer şekilde, MCT ile indüklenen pulmoner arteriyel hipertansiyonun çalışıldığı ve farklı bir eksojen donör olarak NaHS'in kullanıldığı araştırmalarda, tedaviye bağlı pulmoner arter basıncında ve sağ ventrikül hipertrofi oranında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu gösterilmiştir (Feng ve diğerleri, 2017; H. Zhang ve diğerleri, 2019). Farklı bir PAH modeli olarak hipoksi modelinin kullanıldığı başka bir çalışmada aynı şekilde bu parametrelerin H₂S donörü ile tedavi sonucunda azaldığı bildirilmektedir (C. Zhang ve diğerleri, 2003).

Wang ve arkadaşları (2012), sıçan hipoksi modelinde NaHS tedavisinin pulmoner arter düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir. Buna dayanarak, çalışmamızdaki pulmoner arter basıncındaki yükselmenin ve sağ ventrikül hipertrofi gelişiminin eksojen H₂S tedavisiyle azalması,

H₂S'in antiproliferatif ve vazodilatör etki potansiyeli ile ilişkili olabilir. Tek başına Na₂S tedavisi alan grubun sağ ventrikül basınç değerleri ile kontrol grubu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması, çalışmamızda seçilen Na₂S dozunun sağlıklı koşullarda hipotansiyon oluşturmadığının ve bu eksojen H₂S tedavisinin sadece patolojik koşullarda etkili olduğunun göstergesidir. Benzer şekilde aortokavarnal şant ile yüksek pulmoner kan akımının sağlandığı deneysel bir modelde, yalancı operasyon uygulanmış (sham) grupta NaHS tedavisinin pulmoner arter basıncı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı da bildirilmektedir (X. Li, Du, Jin, Geng ve Tang, 2008).

İzole Organ Banyosu Deneyleri

MCT enjeksiyonunun 22. gününde ötenazi edilen sıçanların ana pulmoner arterlerinde izole organ banyosu deneyleri yapılmıştır. 60 mM tek doz KCl kasılmaları kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. KCl, damarlarda membran depolarizasyonuna yol açarak membrandaki voltaja bağlı kalsiyum kanallarının açılmasını sağlar. Ekstraselüler ortamdan hücre içerisine giren kalsiyum iyonu (Ca²⁺), hücre içinde kalsiyum konsantrasyonunun artması ve intraselüler depolardan Ca²⁺ saliverilmesi sonucunda kasılma gerçekleştirir (Jones, Thompson ve Morice, 1997). MCT (105 mg/kg, s.c.) ile deneysel pulmoner hipertansiyonun geliştirildiği sıçanlarda yapılan bir çalışmada, ana pulmoner arterlerin kümülatif KCl kasılma yanıtları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, MCT enjeksiyonundan 4 gün sonra istatistiksel anlamlı düzeyde artmakta, 7 gün sonra istatistiksel anlamlı olmasa da azalmakta ve enjeksiyondan 14 gün sonra ise kasılmadaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ulaşmaktadır (Altiere, Olson ve Gillespie, 1986). Bunun yanında aynı çalışmada 14. günde MCT grubunda anjiyotensin II ve noradrenaline karşı da kasılma yanıtlarında azalma görülmüş ve dolayısıyla MCT uygulamasının 14. günde kastırıcı agonistlere karşı yanıtlarda genel bir azalma bildirilmiştir. Bununla birlikte, bulgularımıza benzer şekilde, başka bir çalışmada da MCT uygulamasından 29 gün sonra sıçanlardan izole edilen pulmoner arterlerde, kontrol sıçanlarından alınan pulmoner arterlere kıyasla KCl kasılma yanıtlarında azalma olduğu bildirmiştir (Mam ve diğerleri, 2010). Biz de çalışmamızda MCT grubunda görülen KCl kasılmalarındaki azalmanın çeşitli nedenleri olabileceğini düşündük. Öncelikle deneylerimizde MCT grubundaki pulmoner arterlerin bazal tonuslarının KCl kasılma yanıtlarındaki azalma ile bir ilişkisi olup olmadığı

araştırılmıştır. Eğer MCT grubundaki arterlerin bazal tonusu diğer gruplara nazaran yüksek bulunursa, damarların KCl'ye karşı daha az kasılacağı düşünölmüştür. Bu amaçla, tüm gruplar arasında KCl öncesi bazal tonuslar karşılaştırılmış ancak gruplar arası istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır. Diğer bir yaklaşım olarak, reseptörden bağımsız gelişen yüksek KCl aracılı membran depolarizasyonunun PAH'lı sıçan pulmoner arterlerinde azalması, pulmoner arter düz kas hücrelerindeki post-reseptör sonrası kasılma yanıtlarındaki bir bozulmayı akla getirmektedir. Bu nedenle çalışmamızda KCl kasılmalarındaki azalma, MCT'nin PAH'da yeniden modellenme oluşturmasına bağılı olarak kasılma fonksiyonlarında ve kontraktıl proteinlerde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanabilir. Ayrıca bu azalmanın nedenini sorgulamak için, MCT ile hücre içi kalsiyum giriş mekanizmaları arasındaki ilişki de araştırılmalıdır. MCT grubunda azalan KCl kasılma yanıtları yani hiporeaktivite, MCT+Na₂S grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde geriye çevrilmiştir. Bu sonuç, 21 gün boyunca Na₂S ile yapılan *in vivo* H₂S tedavisinin KCl kasılmasındaki azalmayı engellediğini ve PAH'da bozulan düz kas yanıtına karşı damarı koruduğunu göstermektedir. Bu koruyucu etki, H₂S'in PAH'daki damar yeniden modellenmesini engellemesinden kaynaklanabilir. KCl kasılmalarında, tek başına Na₂S tedavisi alan grubun kasılma yanıtlarının kontrol grubundaki kasılmalara benzer olması, *in vivo* Na₂S tedavisinin KCl kasılma yanıtlarını sağlıklı koşullarda etkilemediğini sadece patolojik koşullarda bozulan damar yanıtlarını düzenleyerek koruyucu etki meydana getirdiğini göstermektedir. Çalışmamızda KCl sonrası tek doz alınan ACh (10⁻⁵ M) gevşeme yanıtları, kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış, buna karşın MCT+Na₂S grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artarak normalize olmuştur. Benzer şekilde, çalışmamızda fenilefrin ön kastırma sonrasında alınan kümülatif ACh gevşeme yanıtları da, kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış, MCT+Na₂S grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Asetilkolin vasküler endotel hücrelerdeki muskarinik (M₃) reseptörlere bağlanarak, intraselüler Ca²⁺ seviyesinin artmasını sağlar. Hücre içi Ca²⁺ seviyesinin artması, kalsiyum-kalmodulin bağımlı enzim olan eNOS'u aktive eder ve L-arginin'den NO üretimini katalizler. NO düz kastaki sGC enzimini aktive ederek GTP'den sGMP oluşumunu sağlar ve sGMP konsantrasyonunun artması düz kasta gevşemeye neden olur (Moncada S, 1993). Çalışmamızda kullandığımız monokrotalin pulmoner arterlerde endotel

disfonksiyonuna yol açarak pulmoner arteriyel hipertansiyon oluşturmaktadır. PAH'da ACh gevşeme yanıtlarındaki azalma, modelin çalıştığını ve NO yolağının bozularak pulmoner damarlarda endotel disfonksiyonu geliştiğini göstermektedir. H₂S tedavisi uyguladığımız MCT+Na₂S grubunda ACh gevşeme yanıtlarında gördüğümüz bu artışın, NO aracılı gevşemenin bozulduğu durumlarda H₂S aracılı bir kompensasyon mekanizmasının devreye girmesiyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Coletta ve ark.'ları (2012), NO ve H₂S'in farklı yollardan etki göstermelerine karşın, vasküler fonksiyonun fizyolojik kontrolü için bir arada hareket etmelerinin gerekli olduğunu ifade etmektedirler. Aydınoglu ve arkadaşları (2017), fare korpus kaverosumunda muskarinik asetilkolin reseptörlerinden M₁ ve M₃'ün endojen H₂S'nin aracılık ettiği gevşetici etkiye katkıda bulunduğunu ve aynı zamanda L-sisteinin kaverno dokudan ACh salıverilmesini uyardığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda pulmoner arterlerde MCT+Na₂S grubunda hem ACh gevşeme yanıtlarının hem de L-sistein gevşeme yanıtlarının artması, NO, L-sistein/H₂S yolağı ve muskarinik asetilkolin reseptörlerinin bu dokuda da etkileşim halinde olduğunu doğrulamakta ve her iki gasotransmitterin oluşturduğu gevşetici etkide birbirlerinin katkısı olduğunu göstermektedir. H₂S ile NO yolağının ilişkili olduğu literatürde başka çalışmalarda da belirtilmektedir. Yan-fei ve ark.'larının (2008), yaptığı bir çalışmada, sağlıklı sıçan pulmoner arterinde 1 µmol/L adrenalinin oluşturduğu kasılmaya karşı NO donörü SNP ile alınan gevşeme yanıtının, CSE blokeri PAG varlığında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmektedir. Ayrıca literatürde H₂S'in, eNOS aktivitesini artırarak veya sGMP parçalayan fosfodiesterazın inhibisyonuna neden olarak NO/sGMP yolağını stimüle edebileceği de söylenmektedir (Beltowski ve Jamroz-Wisniewska, 2014). Bu yolağın stimülasyonu NO'in vasküler etkilerini kolaylaştırmaktadır.

10⁻⁶ M fenilefrin ön kastırması sonrası 10⁻⁴-2.10⁻³ M konsantrasyon aralığında kümülatif L-sistein yanıtları alınmıştır. Literatürde sıçan ana pulmoner arterinde L-sistein/H₂S yolağının vasküler etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. L-sisteinin pulmoner arterdeki etkileri ilk kez bu çalışma ile gösterilmektedir. L-sistein yanıtlarında ilk iki konsantrasyonda kontrol grubunda gevşeme yanıtı gözlenirken; MCT grubunda ise kasılma yanıtı gözlenmiştir. Bunun yanında L-sistein gevşeme yanıtları diğer bütün konsantrasyonlarda kontrol grubuyla kıyaslandığında MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. İlk iki

konsantrasyonda MCT grubunda görülen bu kasılma yanıtları, *in vivo* Na₂S tedavisinin uygulandığı MCT+Na₂S grubunda istatistiksel olarak anlamlı biçimde gevşemeye dönmüştür. Ayrıca diğer bütün konsantrasyonlarda MCT grubuna kıyasla MCT+Na₂S grubundaki gevşeme yanıtları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Çalışmamızda L-sistein gevşeme yanıtlarında MCT grubuna kıyasla MCT+Na₂S grubunda görülen artış, AOAA (2 mM, 30 dk.) inkübasyonu varlığında değişmemiş hatta 10⁻³, 1.5.10⁻³ ve 2.10⁻³ M konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Biyolojik fonksiyonlar için sentezlenen H₂S'in büyük bir kısmı enzimatik yol ile üretilmektedir. Enzimatik H₂S üretimi CBS, CSE ve 3-MST enzimleri ile yapılmaktadır. AOAA, H₂S sentezleyen enzimlerden ikisinin yani CSE ve CBS'nin genel inhibitörüdür. Asimakopoulou ve ark.'nın (2013), yaptığı çalışmada, AOAA'nın hem *in vivo* hem *in vitro* koşullarda sıçan aortasında L-sistein gevşeme yanıtlarını geri çevirdiği gösterilmiştir. Çalışmamızda MCT+Na₂S grubunda L-sistein gevşeme yanıtlarındaki artışın AOAA varlığında geri dönmemesi, artan L-sistein gevşeme yanıtlarına CSE/CBS aracılı endojen H₂S üretiminin bir katkısı olmadığını göstermektedir. En son keşfedilen H₂S sentezleyici enzim olan 3-MST, diğer iki enzim olan CBS ve CSE'den farklıdır. 3-MST substrat olarak direk L-sisteini kullanmaz ve reaksiyon PLP bağımlı değildir. L-sistein, α-ketoglutarat ile birlikte önce CAT enzimi aracılığıyla 3-MP'ye dönüşmekte ardından da 3-MST enzimi ile H₂S sentezlenmektedir. (Whiteman ve diğerleri, 2015).

H₂S sentezleyen enzimlerin dokulardaki lokalizasyonu ile ilgili olarak literatürde farklı bulgulara rastlanmaktadır. H₂S'in vasküler tonu düzenleyici mekanizmasının anlatıldığı derleme bir makalede, endotelyumda H₂S sentezleyen ana enzimin 3-MST olduğu ve bu şekilde düz kasta gevşeme sağladığı bildirilmektedir (Dongó, Beliczai-Marosi, Dybvig ve Kiss, 2018). Bu düşüncüyü destekleyen pek çok çalışmayı literatürde görmek mümkündür. Bir hücre kültürü çalışmasında sıçan aortası endotel hücrelerinde, 3-MP varlığında H₂S üretiminin gerçekleştiği, aynı literatürde başka bir deney düzeneğinde L-sistein ve α-ketoglutarat hücrelere eklendiğinde H₂S üretildiği, L-sistein ve α-ketoglutarat varlığında gözlenen H₂S üretiminin CAT inhibitörü olan L-aspartat ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın immünohistokimyasal analizinde, torasik aortada 3-MST'nin hem endotelyumda hem de düz kasta lokalize olduğu, CAT'ın ise sadece endotelyumda lokalize olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmanın western blot analizinde torasik aorta endotel tabakasında 3-MST

ekspresyonu görülürken, CBS ve CSE ekspresyonları gözlenmemiştir. (Shibuya, Mikami, Kimura, Nagahara ve Kimura, 2009). Yine başka bir çalışmada, Sun ve ark.'ları, sıçan aortası ve pulmoner arterinde CSE, CBS ve 3-MST enzim ekspresyonları ile NaHS gevşeme yanıtlarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada sıçan aortasında CSE ekspresyonlarının ve NaHS gevşeme yanıtlarının pulmoner artere kıyasla daha fazla olduğu ancak 3-MST enziminin sıçan pulmoner arterinde çok daha fazla eksprese edildiğini western blot ile göstermişlerdir (Sun, Tang, Jin ve Du, 2011). Bu literatür bilgisi, sıçan ana pulmoner arterinde hidrojen sülfür aracılı gevşemeyi katalizleyen esas enzimin 3-MST olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda MCT grubunda L-sistein gevşeme yanıtlarındaki azalmanın nedeni, PAH'da 3-MST enzim ekspresyonunun bozulmasından kaynaklanabilir. MCT+Na₂S grubunda L-sistein gevşeme yanıtlarındaki artış, *in vivo* Na₂S tedavisinin; 1) 3-MST aracılı endojen H₂S üretimini korumasından, 2) eksojen bir donör olarak dokudaki H₂S miktarlarını arttırmamasından kaynaklanabilir. Günümüzde 3-MST'nin spesifik farmakolojik inhibitörü bulunmamaktadır. Deneyle L-aspartat, L-sisteinden 3-MP'ye dönüşümü katalizleyen CAT inhibitörü olarak kullanılmaktadır (Whiteman ve diğerleri, 2015). PAH'da pulmoner arterlerde bu mekanizmanın doğrulanabilmesi için MCT ve MCT+Na₂S grubunda western blot analizi ile CAT ve 3-MST ekspresyonlarına bakılmalı ayrıca da vasküler reaktivite deneyleriyle inhibitör varlığında L-sistein gevşeme yanıtları değerlendirilmelidir. Böylece, 3-MST'nin PAH gelişen pulmoner arterlerdeki rolü ve eksojen H₂S tedavisiyle ilişkisi tam olarak açıklanabilir.

Sıçan ana pulmoner arterinde 10⁻⁶ M fenilefrin ön kastırması sonrası 10⁻⁵-10⁻³ M konsantrasyon aralığında kümülatif Na₂S yanıtları alınmıştır. İlk iki konsantrasyonda kontrol grubunda gevşeme yanıtları gözlenirken; MCT grubunda ise bu yanıtlar azalarak kasılmaya dönmüştür ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. 10⁻⁴ M konsantrasyondaki Na₂S gevşemesi de aynı şekilde MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. 3.10⁻⁴ ve 10⁻³ M konsantrasyonlarda MCT grubuna kıyasla MCT+Na₂S grubundaki gevşeme yanıtı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır.

H₂S'in birçok hücre tipinde düz kastaki K_{ATP} kanallarını açarak gevşetici etki gösterdiği bilinmektedir (R. U. I. Wang, 2003). Bir çalışmada, sıçan pulmoner arterinde NaHS ile alınan gevşeme yanıtının, K_{ATP} kanal blokeri glibenklamid ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (Denizalti, Bozkurt,

Akpulat, Sahin-Erdemli ve Abacioğlu, 2011; Sun ve diğerleri, 2011). H₂S'in, K_{ATP} kanalları üzerindeki moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Literatürde insan embriyonik böbrek hücrelerinde, H₂S'in K_{ATP} kanal kompleksindeki rvSUR1 alt biriminin hücre dışı N terminalindeki Cys6 ve Cys26 kalıntılarıyla etkileşerek kanalı aktive ettiğini (Jiang, Tang, Cao, Wu ve Wang, 2010), çin hamsterı yumurtalık hücrelerinde ise SUR2B'nin sülfidrasyonunu arttırdığını ve Kir6.1'deki tirozin nitrasyonunu değiştirdiğini gösteren (Kang, Hashimoto, Gade ve Akbarali, 2015) moleküler mekanizmalara rastlamak mümkündür.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda pulmoner arterlerde Na₂S gevşeme yanıtının kontrole kıyasla MCT grubunda azalması, monokrotalinle oluşturulan PAH'da pulmoner arterlerde K_{ATP} kanalının aktivitesindeki bir azalmayı düşündürmektedir. Na₂S gevşeme yanıtının, MCT grubuna kıyasla MCT+Na₂S grubunda artması ise, bu yolakta eksojen H₂S tedavisinin koruyucu etkisiyle ilişkilendirilebilir. Bu mekanizmayı sorgulamak amacıyla MCT ve MCT+Na₂S gruplarında K_{ATP} kanal aktivitesi incelenmelidir. Na₂S duyarlılığı (pD₂), kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu azalma üzerinde *in vivo* Na₂S tedavisinin bir etkisi bulunmamıştır. Bu sonuç monokrotalin ile oluşturulan PAH'da reseptör düzeylerinde birtakım değişikliklerin olabileceğine de işaret etmektedir.

Doku H₂S Düzeyleri

Çalışmamızda akciğer ve pulmoner arter doku homojenatlarında monokrotalin ile indüklenen PAH modelinin ve 21 gün süre ile *in vivo* uygulanan Na₂S tedavisinin bazal ve uyarılmış H₂S düzeyleri üzerindeki etkileri metilen mavisi deneyleri ile araştırılmıştır. Bu deneylere göre sıçanlarda akciğer dokusunda bazal H₂S düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Aynı doku homojenatlarında L-sistein ile indüklenmiş H₂S düzeylerinde ise kontrol grubuna kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma görülmüştür. H₂S düzeylerindeki bu azalma, MCT+Na₂S grubunda artış göstermekle birlikte istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır. Sıçanlarda pulmoner arter şant modeli ile yüksek pulmoner kan akımı oluşturulan ve NaHS ile tedavi edilen iki farklı çalışmaya göre, 11 haftanın sonunda sülfid-duyarlı sensör ile akciğer dokusunda ölçülen H₂S düzeyleri kontrol grubuna kıyasla şant grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaktadır (W. Li ve diğerleri, 2009; X. Li ve diğerleri, 2008). Bu

çalışmada eksojen H₂S tedavisinin 11 hafta gibi uzun bir süre yapıldığı dikkat çekicidir. Sıçanlarda monokrotalin ile indüklenmiş pulmoner arteriyel hipertansiyon oluşturulmuş bir başka çalışmada, sıçan akciğer dokusunda TBR4100 radical analyzer ile ölçülen H₂S düzeyleri kontrol grubuna kıyasla monokrotalin grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (Feng ve diğerleri, 2017). Bizim çalışmamız, PAH modellerinde H₂S düzeylerinin azaldığını gösteren bu çalışmalarla uyumludur. Yukarıda bahsedilen PAH modellerinde NaHS tedavisi sonrasında akciğer dokusundaki H₂S düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (Feng ve diğerleri, 2017; W. Li ve diğerleri, 2009; X. Li ve diğerleri, 2008). Sıçan akciğer dokusunda tedavi ile gözlenen H₂S düzeylerindeki artışın bizim deneyimizde görülmemesi nedenlerden biri kullanılan H₂S ölçüm yöntemlerinin farklılığı ve tedavi süresinin uzunluğu ile açıklanabilir. Bir diğer neden ise, çalışmamızda kullandığımız akciğer doku homojenatlarının tüm akciğerden değil rastgele bir parçasından hazırlanması olabilir.

Literatürde sıçan pulmoner arterinde hidrojen sülfür düzeylerinin ölçüldüğü herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Metilen mavisi deneylerine göre sıçan pulmoner arterinde akciğer dokusuna benzer şekilde bazal H₂S düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmamızda pulmoner arterde L-sistein ile indüklenmiş H₂S düzeyleri, kontrole kıyasla MCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış ve MCT+Na₂S grubunda ise bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artarak normalize olmuştur. Pulmoner arterlerde elde ettiğimiz bu sonuç, izole organ banyosu deneylerinde L-sistein gevşeme yanıtlarındaki artış ile örtüşmektedir. L-sistein ile indüklenmiş pulmoner arter homojenatlarında tedavinin etkisiyle H₂S düzeylerinin artması, *in vivo* Na₂S tedavisinin; 1) 3-MST aracılı endojen H₂S üretimini korumasından, 2) eksojen bir donör olarak dokudaki H₂S miktarlarını arttırmasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızda ilk olarak vasküler reaktivite çalışmaları yapılmış ve AOAA varlığında L-sistein yanıtlarının değişmediği görülmüştür. Metilen mavisi deneylerinde bu nedenle AOAA kullanılmadığını belirtmek isteriz.

Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda monokrotalin ile indüklenen pulmoner arteriyel hipertansiyon modeli kullanılmış, pulmoner arter basıncı ve kalp hipertrofinde görülen artış ile modelin başarılı şekilde oluşturulduğu kanıtlanmıştır. Pulmoner arteriyel hipertansiyonda H₂S'in rolü ve tedavi edici etkinliğini araştıran bu çalışmada, *in vivo* H₂S tedavisinin, pulmoner arter basıncındaki artışı ve sağ ventrikül hipertrofini engellemiştir. Pulmoner arteriyel hipertansiyonun patogenizinde görülen endotel disfonksiyonu, modelin PAH oluşturma mekanizmasıdır ve H₂S tedavisinin bu disfonksiyonu düzelttiği görülmüştür. Sıçan ana pulmoner arterinde L-sistein gevşeme yanıtının AOAA varlığında azalmadığı bulunmuştur. Bu sonuç pulmoner arterdeki L-sistein gevşemelerinin, CBS/CSE aracılı değil 3-MST enzimi aracılı gelişen endojen H₂S üretiminden kaynaklanabileceğini ya da tedavinin bir donör gibi davranarak H₂S düzeylerini arttırabileceğini düşündürmektedir. Sıçan ana pulmoner arterinde Na₂S ile oluşan gevşeme yanıtının PAH'lı grupta azaldığı, tedavi grubunda ise arttığı gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmalar göz önünde alındığında bu sonucun hidrojen sülfürün damardaki gevşetici etki mekanizması kabul edilen K_{ATP} kanalları ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu modelde pulmoner arterlerde H₂S düzeylerinin azaldığı, *in vivo* H₂S tedavisinin ise bu azalmayı engellediği görülmüştür.

Günümüzde hala oldukça yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili bir hastalık olan ve tedavisi bulunamayan pulmoner arteriyel hipertansiyona yönelik tedavilerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Araştırmamızda monokrotalin ile oluşturulan PAH modelinde sıçan ana pulmoner arterlerinde H₂S düzeylerinin ölçümü ve H₂S ilişkili yanıtların L-sistein gevşemeleri üzerinden değerlendirilmesi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre, H₂S'in pulmoner arteriyel hipertansiyonda tedavi edici potansiyele sahip olduğunu düşünmekteyiz. Ancak H₂S'in pulmoner arterlerdeki fizyolojik ve patolojik rolünü anlamak için mekanizmalara yönelik daha fazla çalışmanın yapılmasına ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Altieri, R. J., Olson, J. W. ve Gillespie, M. N. (1986). Altered pulmonary vascular smooth muscle responsiveness in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 236(2), 390–395.
- Ariyaratnam, P., Loubani, M. ve Morice, A. H. (2013). Hydrogen sulphide vasodilates human pulmonary arteries: A possible role in pulmonary hypertension? *Microvascular Research*, 90, 135–137. doi:10.1016/j.mvr.2013.09.002
- Asimakopoulou, A., Panopoulos, P., Chasapis, C. T., Coletta, C., Zhou, Z., Cirino, G., ... Papapetropoulos, A. (2013). Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). *British Journal of Pharmacology*, 169(4), 922–932. doi:10.1111/bph.12171
- Aydinoglu, F., Dalkir, F. T., Demirbag, H. O. ve Ogulener, N. (2017). The interaction of L-cysteine/H₂S pathway and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in mouse corpus cavernosum. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 70, 51–58. doi:10.1016/j.niox.2017.08.005
- Beltowski, J. ve Jamroz-Wisniewska, A. (2014). Hydrogen Sulfide and Endothelium-Dependent Vasorelaxation. *Molecules*, 19, 21183–21199. doi:10.3390/molecules191221183
- Bhatnagar, A., Wiesen, J., Dweik, R. ve Chaisson, N. F. (2018). Evaluating suspected pulmonary hypertension: A structured approach. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 85(6), 468–480. doi:10.3949/ccjm.85a.17065
- Campian, M. E., Hardziyenka, M., Michel, M. C. ve Tan, H. L. (2006). How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 373(6), 391–400. doi:10.1007/s00210-006-0087-9
- Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., ... Szabo, C. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 9161–9166. doi:10.1073/pnas.1202916109
- Condon, D. F., Nickel, N. P., Anderson, R., Mirza, S. ve de Jesus Perez, V. A. (2019). The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension: what's old is new.

F1000Research, 8, 1–8. doi:10.12688/f1000research.18811.1

- Denizalti, M., Bozkurt, T. E., Akpulat, U., Sahin-Erdemli, I. ve Abacioğlu, N. (2011). The vasorelaxant effect of hydrogen sulfide is enhanced in streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383(5), 509–517. doi:10.1007/s00210-011-0601-6
- Dongó, E., Beliczai-Marosi, G., Dybvig, A. S. ve Kiss, L. (2018). The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 81, 75–87. doi:10.1016/j.niox.2017.10.010
- Feng, S., Chen, S., Yu, W., Zhang, D., Zhang, C., Tang, C., ... Jin, H. (2017). H₂S inhibits pulmonary arterial endothelial cell inflammation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Laboratory Investigation*, 97(3), 268–278. doi:10.1038/labinvest.2016.129
- Foshat, M. ve Boroumand, N. (2017). The evolving classification of pulmonary hypertension. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(5), 696–703. doi:10.5858/arpa.2016-0035-RA
- Galie, N. Hoeper, M. M. Humbert, M., Torbicki, A. Vachiery, J.-L. Barbera, J. A. Beghetti, M. Corris, P., Gaine, S. Gibbs, J. S., Gomez-Sanchez, M. A., Jondeau, G. Klepetko, W., Opitz, C. Peacock, A., ... Zamorano, J. L. (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the Internat. *European Heart Journal*, 30(20), 2493–2537. doi:10.1093/eurheartj/ehp297
- Galie`*, H. (2016). Comments on the 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *European Heart Journal (2016) 37*, 67–119, 69(2), 102–108. doi:10.1016/j.recesp.2015.11.032
- Gomez-Arroyo, J. G., Farkas, L., Alhussaini, A. A., Farkas, D., Kraskauskas, D., Voelkel, N. F. ve Bogaard, H. J. (2011). The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(4), L363–L369. doi:10.1152/ajplung.00212.2011
- Harrison W. Farber, M.D., and Joseph Loscalzo, M.D., P. D. (2004). Pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 1655–1665. doi:10.1056/nejmra035488

- Hoeper, M. M., Ghofrani, H.-A., Grünig, E., Klose, H., Olschewski, H. ve Rosenkranz, S. (2017). M E D I C I N E Pulmonary Hypertension, 73–84. doi:10.3238/arztebl.2017.0073
- Hosoki, R., Matsuki, N. ve Kimura, H. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 527–531. doi:10.1006/bbrc.1997.6878
- Humbert, M., Morrell, N. W., Archer, S. L., Stenmark, K. R., MacLean, M. R., Lang, I. M., ... Rabinovitch, M. (2004). Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12 SUPPL.), S13–S24. doi:10.1016/j.jacc.2004.02.029
- Ilgın, S., Burukoglu, D., Atli, O. ve Sirmagül, B. (2012). Effects of everolimus in combination with sildenafil in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovascular Toxicology*, 12(1), 46–55. doi:10.1007/s12012-011-9137-8
- Ishak Gabra, N. B., Mahmoud, O., Ishikawa, O., Shah, V., Altshul, E., Oron, M. ve Mina, B. (2019). Pulmonary Arterial Hypertension and Therapeutic Interventions. *International Journal of Angiology*, 28(02), 080–092. doi:10.1055/s-0039-1692452
- Jeffery, T. K. ve Morrell, N. W. (2002). Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 45(3), 173–202. doi:10.1053/pcad.2002.130041
- Jeffery, Trina K. ve Wanstall, J. C. (2001). Pulmonary vascular remodeling: A target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacology and Therapeutics*, 92(1), 1–20. doi:10.1016/S0163-7258(01)00157-7
- Jiang, B., Tang, G., Cao, K., Wu, L. ve Wang, R. (2010). Molecular mechanism for H₂S-induced activation of K⁺ (ATP) channels. PubMed Commons, 12(2), 19769462. doi:10.1089/ars.2009.2894.Molecular
- Jones, R. D., Thompson, J. S. ve Morice, A. H. (1997). The effect of hydrogen peroxide on hypoxia, prostaglandin F_{2α} and potassium chloride induced contractions in isolated rat pulmonary arteries. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 10(1), 37–42. doi:10.1006/pupt.1997.0071
- Kang, M., Hashimoto, A., Gade, A. ve Akbarali, H. I. (2015). Interaction between hydrogen sulfide-induced sulfhydration and tyrosine nitration in the KATP

- channel complex. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(6), G532–G539. doi:10.1152/ajpgi.00281.2014
- Kay, J. M., Crawford, N. ve Heath, D. (1967). Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax*, 22, 176. doi:10.1007/BF02147819
- Kay, J. M., Smith, P., Heath, D. ve Will, J. A. (1976). Effects of phenobarbitone, cinnarizine, and zoxazolamine on the development of right ventricular hypertrophy and hypertensive pulmonary vascular disease in rats treated with monocrotaline. *Cardiovascular Research*, 10(2), 200–205. doi:10.1093/cvr/10.2.200
- Kay, J. Michael. (2017). *Crotalaria* (Monocrotaline) Pulmonary Hypertension: The Fiftieth Anniversary. *Chest*, 152(6), 1117–1119. doi:10.1016/j.chest.2017.06.013
- Kucukoglu, M. S. (2016). The new insights of 2015 ESC Pulmonary Hypertension Guidelines. *Turk Kardiyoloji Dernegi Arsivi-Archives of the Turkish Society of Cardiology*, 44(1), 4–8. doi:10.5543/tkda.2015.57422
- Lai, Y. L., Olson, J. W. ve Gillespie, M. N. (2017). Ventilatory dysfunction precedes pulmonary vascular changes in monocrotaline-treated rats. *Journal of Applied Physiology*, 70(2), 561–566. doi:10.1152/jappl.1991.70.2.561
- Lan, N., Massam, B., Kulkarni, S. ve Lang, C. (2018). Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases*, 6(2), 38. doi:10.3390/diseases6020038
- Li, W., Jin, H. F., Liu, D., Sun, J. H., Jian, P. J., Li, X. H., ... Du, J. B. (2009). Hydrogen sulfide induces apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow. *Chinese Medical Journal*, 122(24), 3032–3038. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.24.023
- Li, X., Du, J., Jin, H., Geng, B. ve Tang, C. (2008). Sodium hydrosulfide alleviates pulmonary artery collagen remodeling in rats with high pulmonary blood flow. *Heart and Vessels*, 23(6), 409–419. doi:10.1007/s00380-008-1059-4
- Ma, Z., Mao, L. ve Rajagopal, S. (2016). Hemodynamic characterization of rodent models of pulmonary arterial hypertension. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(110), 1–10. doi:10.3791/53335
- Mam, V., Tanbe, A. F., Vitali, S. H., Arons, E., Christou, H. A. ve Khalil, R. A. (2010).

- Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2), 455–562. doi:10.1124/jpet.109.160119
- Marsboom, G. R. ve Janssens, S. P. (2004). Models for pulmonary hypertension. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 1(3), 289–296. doi:10.1016/j.ddmod.2004.11.026
- Medarov, B. I. ve Judson, M. A. (2015). The role of calcium channel blockers for the treatment of pulmonary arterial hypertension: How much do we actually know and how could they be positioned today? *Respiratory Medicine*, 109(5), 557–564. doi:10.1016/j.rmed.2015.01.004
- Moncada S, H. A. (1993). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med*, 329, 2002–2012.
- Montani, D., Chaumais, M. C., Guignabert, C., Günther, S., Girerd, B., Jaïs, X., ... Humbert, M. (2014). Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology and Therapeutics*, 141(2), 172–191. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.002
- Nakazawa, H., Hori, M., Ozaki, H. ve Karaki, H. (1999). Mechanisms underlying the impairment of endothelium-dependent relaxation in the pulmonary artery of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 128(5), 1098–1104. doi:10.1038/sj.bjp.0702878
- Nogueira-Ferreira, R., Vitorino, R., Ferreira, R. ve Henriques-Coelho, T. (2015). Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 35, 8–16. doi:10.1016/j.pupt.2015.09.007
- Öngen, D. G. (2011). PULMONER HİPERTANSİYON. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları*, 2(5), 255. ??? adresinden erişildi.
- Öztürk, Ö. ve Sahin, Ü. (2009). Pulmoner arteriyel hipertansiyon: tanı ve tedavisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(1), 39–47. doi:10.17343/sdutfd.36555
- Papapetropoulos, A., Whiteman, M. ve Cirino, G. (2015). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: A brief, introductory guide for beginners. *British Journal of Pharmacology*, 172(6), 1633–1637. doi:10.1111/bph.12806
- Parikh, V., Bhardwaj, A. ve Nair, A. (2019). Pharmacotherapy for pulmonary arterial

- hypertension. *Journal of Thoracic Disease*, 11(Suppl 14), S1767–S1781. doi:10.21037/jtd.2019.09.14
- Shekunov, B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H. H. Y. ve Chow, A. H. L. (2007). Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. *Pharmaceutical Research*, 24(2), 203–227. doi:10.1007/s11095-006-9146-7
- Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Nagahara, N. ve Kimura, H. (2009). Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of Biochemistry*, 146(5), 623–626. doi:10.1093/jb/mvp111
- Sun, Y., Tang, C. S., Jin, H. F. ve Du, J. B. (2011). The vasorelaxing effect of hydrogen sulfide on isolated rat aortic rings versus pulmonary artery rings. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(4), 456–464. doi:10.1038/aps.2011.9
- Szabó, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(11), 917–935. doi:10.1038/nrd2425
- Sztuka, K. ve Jasińska-Stroschein, M. (2017). Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. *Pharmacological Research*, 125, 201–214. doi:10.1016/j.phrs.2017.08.003
- Tuder, R. M., Archer, S. L., Dorfmueller, P., Erzurum, S. C., Guignabert, C., Michelakis, E., ... Morrell, N. W. (2013). Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25 SUPPL.). doi:10.1016/j.jacc.2013.10.025
- Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*, 92(2), 791–896. doi:10.1152/physrev.00017.2011
- Wang, R. U. I. (2003). The Gasotransmitter Role of Hydrogen Sulfide. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING Volume 5, Number 4, 2003* © Mary Ann Liebert, Inc., 5(4).
- Whiteman, M. ;, Perry, A., Zhou, Z., Bucci, M., Papapetropoulos, A., Cirino, G. ve Wood, M. E. (2015). H₂S synthesizing enzymes: Biochemistry and molecular aspects. *Handbook of Experimental Pharmacology* (C. 230). doi:10.1007/978-3-319-18144-8_1
- Wilson, D. W., Segall, H. J., Pan, L. C., Lamé, M. W., Estep, J. E. ve Morin, D. (1992). Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Critical*

- Reviews in Toxicology*, 22(5–6), 307–325. doi:10.3109/10408449209146311
- Yan-fei, W., Prabha, M., Chao-shu, T., Lin, S. H. I., Chun-yu, Z., Hui, Y. A. N., ... Jun-bao, D. U. (2008). Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats, *IJ*(30425010), 420–423.
- Yildiz, P. (2009). Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clinica Chimica Acta*, 403(1–2), 9–16. doi:10.1016/j.cca.2009.01.018
- Zhang, C., Du, J., Bu, D., Yan, H., Tang, X. ve Tang, C. (2003). The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302(4), 810–816. doi:10.1016/S0006-291X(03)00256-0
- Zhang, H., Lin, Y., Ma, Y., Zhang, J., Wang, C. ve Zhang, H. (2019). Protective effect of hydrogen sulfide on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via inhibition of the endothelial mesenchymal transition. *International Journal of Molecular Medicine*, 44(6), 2091–2102. doi:10.3892/ijmm.2019.4359
- Zhang, M., Chang, Z., Zhao, F., Zhang, P., Hao, Y.-J., Yan, L., ... Zhou, R. (2019). Protective Effects of 18 β -Glycyrrhetic Acid on Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 10(January), 1–11. doi:10.3389/fphar.2019.00013

Ekler

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2018-079
KONU: Onay

25.07.2018

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda "PULMONER ARTER HİPERTANSİYONUNDA SILDENAFİL'İN YARARLI ETKİLERİNDE HİDROJEN SÜLFÜRÜN ROLÜ VAR MI?" isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Doç.Dr. Gülnur Sevin, Ege Üni. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD
Biyokimyager Kumru Turhan, Ege Üniversitesi Eczacılık Fak. Farmakoloji AD
Prof.Dr. Günay Yetik-Anacak, Ege Üni. Ecz.Fak. Farmakoloji AD

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 60 adet erkek sıçan deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurumumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. Lokman ÖZPÜRK
(E.Ü. Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

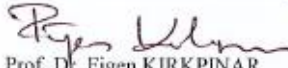

Prof. Dr. N. Ülku KARABAY YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Aytül ÖNAL

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL **KATILMADI**

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN **KATILMADI**


Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Prof. Dr. Uğur KAYA **KATILMADI**


Dr. Öğretim Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI

Öğr. Gör. Dr. M. Ayberk OKTAY


Vet. Hek. F. Emrah SOYLU

Özcan NALBANTOĞLU


Tıngiz ÖZCAN **KATILMADI**

Teşekkür

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca değerli bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana her türlü imkanı sağlayan çok saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Gülnur SEVİN'e,

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı'ndaki bütün Öğretim Üyelerine,

Bilgisi ve yorumlarıyla tez çalışmamda destek olan değerli Prof. Dr. Günay YETİK ANACAK'a,

Bilgilerini benimle paylaşarak tezimde yardımcı olan kıymetli Doç. Dr. Mehmet ARUN'a,

Tez çalışmamda bana her zaman yardımcı olan arkadaşlarım Araş. Gör. Elif ALAN ve Mehmet ŞEN'e,

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi personeli kıymetli Ahmet DEMİRAL'a,

Çalışmam boyunca beni her zaman teşvik eden meslektaş ve dostlarım Damla GETBOĞA, Meltem DURSUN ve sevgili arkadaşım Nazlıcan BELEN'e,

Bana arkadaştan öte bir kardeş olan, her zaman beni dinleyen sevgili lise arkadaşım Bilge KARAKOÇ'a,

Uzakta da olsa her zaman yanımda olmayı başaran ve beni hep destekleyen canım Mehmet BADEMCI'ye,

Her adımında benim arkamda olan ve başaracağıma olan inançlarını asla kaybetmeyerek beni yüreklendiren, hayattaki en büyük şansım canım aileme sonsuz teşekkürler.

İzmir, 4.02.2020

Kumru TURHAN

Özgeçmiş

Yüksek Lisans

Ege Üniversitesi– İzmir

Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 2016-Devam ediyor.

Lisans

Ege Üniversitesi– İzmir

Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2012 –2016

E-posta: kmruturhan.93@gmail.com

Telefon: +905442550410

