



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZOLE TAVŞAN ALT ÖZEĞAGUS SFİNKTERİNDE
ELEKTRİKSEL ALAN UYARISI ARACILI NÖROJENİK
KASILMA YANITLARI ÜZERİNE HİDROJEN SÜLFÜR'ÜN
GEVŞETİCİ ETKİSİNİN MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ayşegül KOÇ

TIBBİ FARMAKOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2023

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZOLE TAVŞAN ALT ÖZEFAGUS SFİNKTERİNDE
ELEKTRİKSEL ALAN UYARISI ARACILI NÖROJENİK
KASILMA YANITLARI ÜZERİNE HİDROJEN
SÜLFÜR'ÜN GEVŞETİCİ ETKİSİNİN
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ayşegül KOÇ

TIBBİ FARMAKOLOJİ PROGRAMI

**Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir
(Proje No: TDK-2020-2113)**

Ankara,2023

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İzole Tavşan Alt Özefagus Sfinkterinde Elektriksel Alan Uyarısı Aracılı Nörojenik
Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Gevşetici Etkisinin Mekanizmasının
Araştırılması

Ayşegül KOÇ

Doktora Tezi

20.09.2023

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Halil KARA

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN
Prof. Dr. Aslı Fahriye CEYLAN
Prof. Dr. Halil KARA
Prof. Dr. Oğuzhan YILDIZ
Doç. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için
gerekten tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Sena KAPLAN
Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.
20.09.2023

Ayşegül KOÇ



TEŞEKKÜR

Tüm doktora eğitimim ve tez sürecimde büyük katkıları olan, bilimsel ve mesleki tecrübelerini aktaran ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN'a,

Tez çalışmamın her aşamasında ve doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşan, anlayış ve hoşgörüsüyle her konuda desteğini hissettiğim çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Halil KARA'ya

Doktora tez sürecimde büyük bir sabır ve titizlikle bana yardımcı olan ve yol göstermesi; beni hiç yalnız bırakmaması ve tez çalışmam boyunca her aşamada destekleriyle, motivasyonumu hep yüksek tuttuğu için sevgili hocam, Doç. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN'a ve çalışmam boyunca yanımda olan Uzm. Dr. Derya Sebile KOÇ ve Dr. Celil İlker AŞKIN'a ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma,

Katkılarından dolayı Prof. Dr. Aslı Fahriye CEYLAN, Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ayşenur ÇAM ÖZÜNLÜ ve Dr. Öğr. Üyesi Fatma UYSAL hocalarıma ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca destek ve ilgileri ile hep yanımda olan, doktora eğitimim boyunca sabır ve anlayış gösteren, sıkıntılarımı paylaşan değerli annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİN.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Özefagus Anatomi ve Histolojisi	5
2.2. Alt Özefagus Sfinkteri (AÖS):	8
2.2.1. AÖS Anatomisi:	8
2.2.2. AÖS Motor Nöronal Anatomisi:	9
2.2.3. AÖS Bazal Tonusu	11
2.3. Hidrojen Sülfür (H ₂ S)	14
2.3.1. H ₂ S'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	16
2.3.2. Memelilerde H ₂ S'in Endojen Sentezi ve Katabolizması.....	17
2.3.3. Hidrojen Sülfür'ün Diğer Sistemler Üzerine Etkileri	23
2.3.4. Hidrojen Sülfür'ün Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri.....	25
2.4. Memelilerde NO sentezi ve metabolizması:	27
2.4.1. NO sinyal yolları.....	28
2.5. H ₂ S ve NO ilişkisi:.....	28
2.6. Potasyum Kanalları:.....	30
2.7. H ₂ S ve Potasyum Kanalları ilişkisi.....	35
3.GEREÇ-YÖNTEM	37
3.1. Deney Hayvanı	37
3.2. İzole Tavşan Alt Özefagus Sfinkter Preparatının Hazırlanması	37
3.3. İzole Organ Banyosu Sistemi.....	37
3.4. Deney Protokolü	40
3.4.1. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarının Tanımlanması:	41
3.4.2. H ₂ S'in EAU-Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına Etkisinin Değerlendirilmesi:	42
3.4.3. Postsinaptik Yanıtların Tanımlanması:	42
3.4.4. L-Sistein ve H ₂ S Donörünün Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Katkısı:	43
3.4.5. H ₂ S Sentez İnhibitörlerinin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin Katkısı:	43
3.5. Deneylerde Kullanılan Solüsyon ve Maddeler	44

3.6. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz	45
4.BULGULAR:	46
4.1. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarının Tanımlaması:.....	46
4.2. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine H ₂ S'in Etkisi:.....	47
4.3. EAU aracılı NO-Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine H ₂ S Donörünün Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:	53
4.4. EAU aracılı NO-Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine H ₂ S Donörünün Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:	54
4.5. EAU aracılı NO-Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine L-Sistein'in Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:	55
4.6. EAU aracılı NO-Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine L-Sistein'in Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:	56
4.7. EAU aracılı NO-Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine H ₂ S Sentez İnhibitörlerinin Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:	57
4.8. EAU aracılı NO-Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine H ₂ S Sentez İnhibitörlerinin Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:	59
4.9. Ekzojen Potasyum Klorür (KCl) ve Kalsiyum (Ca ⁺²) ile Oluşan Kasılma Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi:	61
5.TARTIŞMA	62
6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER:	71
7.KAYNAKLAR.....	75
8.EKLER.....	88
Ek-1. Etik Kurul Raporu.....	88

ÖZET

İzole Tavşan Alt Özefagus Sfinkterinde Elektriksel Alan Uyarısı Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Gevşetici Etkisinin Mekanizmasının Araştırılması

H₂S, gastrointestinal sistemde önemli bir fizyolojik inhibitör nörotransmitterdir. Son çalışmalar H₂S'in farklı dokularda endojen olarak sentezlenebildiğini ve NO ile birçok dokuda etkileşime girdiğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı, AÖS'nin EAU ile indüklenen nörojenik kontraktıl yanıtlar üzerindeki H₂S etkisine çeşitli K⁺ kanallarının ve NO katkısını araştırmaktır. Tavşan izole AÖS şeritlerinin EAU ile indüklenen kasılma yanıtları, Krebs-Henseleit çözeltileri içeren organ banyolarında kuvvet transdüserleri kullanılarak kaydedilmiştir. NaHS (H₂S donörü, 10⁻⁶-3x10⁻³M), L-Sistein (H₂S prekürsörü, 10⁻⁵-3x10⁻³M), PAG ve AOAA'nın (H₂S sentez enzim inhibitörleri, 10⁻⁵-3x10⁻³M) kümülatif dozlarının NO bağımlı ve NO bağımsız (L-NAME varlığında) gruplarda EAU aracılı kasılma yanıtları üzerindeki etkileri değerlendirildi. Her bir grubun etkileri, Glibenklamid (K_{ATP} kanal blokörü), TEA (non-selektif K kanal blokörü), 4-AP (K_V kanal blokörü) ve İberiotoksin (K_{Ca} kanal blokörü) varlığında tekrar değerlendirildi.

Hem NO bağımlı hem de NO bağımsız gruplarda, NaHS, L-Sistein, PAG ve AOAA, EAU aracılı kasılma yanıtlarını önemli ölçüde azalttı. NO bağımlı grupta, NaHS ve L-Sistein'in etkisi 4-AP varlığında azaldı, ayrıca NaHS'nin etkisi NO bağımlı ve bağımsız grupta TEA varlığında azaldı. NO'dan bağımsız grupta, K⁺ kanal blokörleri L-Sistein ile indüklenen gevşemeleri değiştirmede. K⁺ kanal blokörlerinin PAG ve AOAA'nın etkileri üzerinde etkisi olmamıştır. Ayrıca, NaHS 80-mM KCl ile indüklenen kasılmaları önemli ölçüde gevşetirken, L-Sistein, PAG ve AOAA gevşetmedi. Bu çalışmada H₂S, EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerini azaltmıştır. Bu sonuçlar, K_V kanallarının ve NO'nun, alt özefagus sfinkter düz kası üzerindeki eksojen H₂S ve endojen H₂S öncüsü L-Sistein inhibitör etkisine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hidrojen sülfür, l-sistein, potasyum kanalları, nitrik oksit, alt özefagus sfinkteri, elektriksel alan uyarısı

ABSTRACT

Investigation of the Mechanism of the Relaxing Effect of Hydrogen Sulfide on Electrical Field Stimulation-Mediated Neurogenic Contractile Responses in the Isolated Rabbit Lower Esophageal Sphincter

H₂S is a significant physiological inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract. Recent studies have shown that H₂S can be synthesised endogenously in different tissues and interacts with NO in many tissues. The aim of this study was to investigate the contribution of various K⁺ channels and NO to the H₂S effect on EFS-induced neurogenic contractile responses of the LES. EFS-induced contractile responses of rabbit isolated LES strips were recorded using force transducers in organ baths containing Krebs-Henseleit solutions. The effects of cumulative doses of NaHS (H₂S releaser, 10⁻⁶-3x10⁻³M), L-Cysteine (H₂S precursor, 10⁻⁵-3x10⁻³M), PAG and AOAA (H₂S synthesis enzyme inhibitors, 10⁻⁵-3x10⁻³ M) on EFS-mediated contraction responses in NO-dependent and NO-independent (in the presence of L-NAME) groups were evaluated. The effects of each group were re-evaluated in the presence of Glibenclamide (K_{ATP} channel blocker), TEA (non-selective K channel blocker), 4-AP (K_V channel blocker) and Iberitoxin (K_{Ca} channel blocker).

In both NO-dependent and NO-independent groups, NaHS, L-Cysteine, PAG and AOAA significantly reduced EFS-mediated contractile responses. In the NO-dependent group, the effect of NaHS and L-Cysteine was reduced in the presence of 4-AP, also the effect of NaHS was reduced in the presence of TEA in the NO-dependent and independent group. In the NO-independent group, K⁺ channel blockers did not change L-Cysteine-induced relaxations. K⁺ channel blockers had no effect on the effects of PAG and AOAA. Furthermore, NaHS significantly relaxed 80-mM KCl-induced contractions, whereas L-Cysteine, PAG and AOAA did not. In this study, H₂S reduced the amplitudes of EFS-induced contraction responses.

These results suggest that K_V channels and NO significantly contribute to the inhibitory effect of exogenous H₂S and endogenous H₂S precursor L-Cysteine on lower oesophageal sphincter smooth muscle.

Keywords: Hydrogen sulphide, l-cysteine, potassium channels, nitric oxide, lower esophageal sphincter, electrical field stimulation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
α	: Alfa
β	: Beta
μM	: Mikromolar
ppm	: Milyonda bir birim
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
3-MP	: 3-merkaptopirüvat
3-MST	: 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz
4-AP	: 4-Aminopiridin
ACh	: Asetilkolin
AOAA	: Aminooksiasetik asit
AÖS	: Alt özofagus sfinkteri
ATP	: Adenozin-3-fosfat
BH_4	: Tetrahidrobiopterin
Ca^{+2}	: Kalsiyum
CAT	: Sistein aminotransferaz
CB1	: Kannabinoid reseptörü
CBS	: Sistasyonin beta-sentaz
CCK	: Kolesistokinin
CGRP	: Kalsitonin geni ile ilişkili peptid
CO	: Karbonmonoksit
CO_2	: Karbondioksit
COX	: Siklooksijenaz
CSE	: Sistasyonin gama liyaz
DAO	: D-aminoasit oksidaz
DMN	: Dorsal motor çekirdek
DMPD	: N,N -dimetil-p-fenilendiamin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EAU	: Elektriksel alan uyarısı
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
GİS	: Gastrointestinal sistem
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
HS ⁻	: Hidrosülfür
K ⁺	: Potasyum
K _{2P}	: İki gözenekli alan potasyum kanalı
K _{Ca}	: Kalsiyumla aktive olan potasyum kanalı
K _{Cl}	: Potasyum klorür
K _{IR}	: İçe doğru potasyum kanalı
K _V	: Voltaj kapılı potasyum kanalı
L-NAME	: L-NG-Nitro arjinin metil ester
NADPH	: Nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat
NaHS	: Sodyum hidrojen sülfür
NANK	: Non-Adrenerjik, Non-Kolinerjik
NERD	: Eroziv olmayan reflü hastalığı
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
nM	: Nanomolar
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O ₂	: Oksijen
PAG	: Proparjil glisin
PKC	: Protein kinaz C
S ⁻²	: Sülfür iyonu
sAMP	: Siklik adenosin monofosfat
sGMP	: Siklik guanozin monofosfat
SK _{Ca}	: Küçük iletkenli kalsiyum ile aktive edilen potasyum kanalı
SUR	: Sülfonilüre reseptörü
TEA	: Tetraetilamonyum
TLESR	: Geçici AÖS gevşemesi
TMST	: Tiyol-S-metiltransferaz
ÜÖS	: Üst özefagus sfinkteri
VIP	: Vazoaktif intestinal polipeptid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Memeli hücrelerinde hidrojen sülfürün (H_2S) biyosentezi ve katabolizması.....	18
Şekil 3.1 AÖS şeritlerinin banyolara asılma işlemi.....	38
Şekil 3.2. İzole Doku Banyosu Kayıt ve Analiz Sistemi-I	39
Şekil 3.3. İzole Doku Banyosu Kayıt ve Analiz Sistemi-II	39
Şekil 4.1. EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine Atropin (10^{-6} M)	46
Şekil 4.2.1 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M)’nin etkisi.....	47
Şekil 4.2.2 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M)’in etkisi.....	49
Şekil 4.2.3 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M)’in etkisi.....	50
Şekil 4.2.4 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine PAG (10^{-5} - 3×10^{-3} M)’in etkisi.....	51
Şekil 4.2.5 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M)’nin etkisi.....	52
Şekil 4.3 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı nörojenik kasılma yanıtları üzerine NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M)’nin etkisi.....	53
Şekil 4.4 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız nörojenik kasılma yanıtları üzerine NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M)’nin etkisi.	54
Şekil 4.5 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı nörojenik kasılma yanıtları üzerine L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M)’nin etkisi.....	55
Şekil 4.6 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız nörojenik kasılma yanıtları üzerine L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M)’nin etkisi.	56
Şekil 4.7.1 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı nörojenik kasılma yanıtları üzerine PAG (10^{-5} - 3×10^{-3} M)’in etkisi.....	57

Şekil 4.7.2 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı nörojenik kasılma yanıtları üzerine AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'ın etkisi.	58
Şekil 4.8.1 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız nörojenik kasılma yanıtları üzerine PAG (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'ın etkisi.	59
Şekil 4.8.2 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız nörojenik kasılma yanıtları üzerine AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'ın etkisi.	60
Şekil 4.9 80 mM KCl ile kastırılmış dokularda NaHS (10^{-6} - 3×10^{-3} M)'ın gevşetici etkisi.	61

1. GİRİŞ

Hidrojen sülfür (H_2S), kuvvetli, çürük yumurta kokusu ile karakteristik, yanıcı, uçucu ve suda çözünebilen bir gazdır. Uzun yıllardır nörotoksik ve çevresel bir toksik gaz olarak bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarla H_2S 'in memeli dokusunda endojen sentezi ve fizyolojik etkileri ilk defa gösterilmiştir. H_2S , NO ve CO gibi nöromodülatör etkili önemli bir gaz-transmitter olarak kabul edilmiştir. Buradan hareketle çeşitli organ ve sistemlerde biyolojik etki mekanizmalarının araştırılması ile son yıllarda ilgi odağı haline gelmiş bir konudur.

Hidrojen sülfür (H_2S)'ün fizyolojik rolü, ilk defa beyindeki varlığının tespit edilmesi ile ortaya konmuştur (Abe & Kimura, 1996). Beyin, kardiyovasküler sistem, akciğer, karaciğer ve böbrekler gibi birçok dokuda yüksek düzeyde üretildiği tespit edilmiştir. Endojen H_2S üretimi, sülfür içerikli bir aminoasit olan L-Sistein'den Sistasyonin beta sentaz (CBS), Sistasyonin gama liyaz (CSE) ve 3-merkaptosülfürtransferaz (3-MST) enzimleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. H_2S üretiminden sorumlu CBS enziminin yaygın olarak beyin ve böbrekte bulunduğu, CSE enziminin ise ince bağırsak, mide, pankreas, uterus, portal ven ve torasik aort, plasenta gibi daha geniş bir yelpazede dokularda dağılımı gösterilmiştir. 3-MST enzimi ise, karaciğerdeki hepatositleri, kalp hücreleri ve nöroglial hücreler vb birçok dokuda CBS ve CSE enzime benzer şekilde yaygın şekilde bulunmaktadır.

Kan damarlarında üretilen H_2S 'in, lökosit-endotel hücre etkileşimlerini inhibe ettiği, vazodilatasyon yaptığı ve kan basıncını düzenlediği bilinmektedir. Çeşitli çalışmalarda da hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, şok gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde düzenleyici role sahip olduğu gösterilmiştir. Solunum sisteminde yapılan çalışmalar, CBS ve CSE enzimlerinin tespit edilebilir düzeyde eksprese edildiğini göstermiştir. Endojen H_2S 'in akciğer hastalıkları ve viral enfeksiyonlar da dahil solunum hastalıkları patogenezindeki rolü, güncel olarak araştırılmaya devam etmektedir. GİS üzerinde yapılan çalışmalarda ise gastrik mukozada CBS ve CSE enzimlerinin varlığı gösterilmiştir. Tavşan ve kobayda yapılan çalışmalarda, H_2S 'in spontan veya ACh'ın indüklediği ileum

kontraksiyonlarını inhibe ettiği bildirilmiştir (Hosoki vd., 1997; Teague vd., 2002). NO ve CO gibi mediyatörlere benzer olarak güçlü inhibitör etkili bir gaz-transmitter olabileceği ileri sürölmektedir. Fare ve sıçan kolonunda yapılan çalışmalarda ise, L-Sistein'den (endojen öncölü) enzimatik olarak üretildiğini, CSE enzim inhibitörü, DL-propargilglisin (PAG) ve CBS ve CSE enzim inhibitörü, aminooksiasetik asit (AOAA) uygulaması ile endojen H₂S üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Gil vd., 2011; Linden vd., 2008).

Mitokondriyal sitokrom C oksidaz enziminin inhibisyonu, H₂S toksisitesinin esas mekanizmasıdır (Reiffenstein vd., 1992). Fizyolojik sistemlerde, düşük konsantrasyonlarda H₂S'in mitokondriyal elektron donörü olarak memeli hücrelerinde elektron taşınmasının uyarıcısı olduğu ve enerji üretimine katkıda bulunduğu, yüksek konsantrasyonlarda ise siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ettiği bilinmektedir (Szabo vd., 2014). H₂S'in toksik etkilerini halen fizyolojik etkilerden ayırmak zordur. Ancak sülfür tuzları (NaHS ve Na₂S) fizyolojik çalışmalarda en yaygın kullanılan H₂S donörleridir. Yüksek dozda kullanılan H₂S donörleri, kan ve dokulardaki H₂S konsantrasyonlarının fizyolojik seviyelere yükselmesine ve ardından hızlı bir düşüş ile azalmasına neden olmaktadır. alışmalar H₂S donörü NaHS'nin elektriksel alan stimölasyonu (EAU) üzerindeki inhibisyon etkisinin tersine çevrilmesi veya kasılma yanıtlarının düzenlenmesi etkilerinin, memeli mitokondrisinde düzenleyici bir mekanizmanın varlığını ortaya koyduğunu, böylece sülfür detoksifikasyonunun yüksek sülfür konsantrasyonu varlığında bile devam edebileceğini göstermiştir (Hildebrandt, 2011; Olson & Straub, 2016). Bu sonuçlar, araştırmalarda yüksek konsantrasyonlarda NaHS kullanılsa bile kalıcı hücresel hasarın ortadan kaldırılabileceğini ortaya koymuştur.

Gastrointestinal sistemde, özefagusun motor fonksiyon bozuklukları olarak bilinen hastalıklar ve diğer hastalıklara sekonder gelişen bozuklukların patofizyolojisi; yutma sırasında özefagusta peristaltizmin bozulması ve alt özefagus sfinkteri (AÖS)'nin yetersiz veya fazla gevşemesi olduğu düşünölmektedir. AÖS'nin gastrointestinal sistem hastalıklarındaki rolü bilinmesine rağmen, AÖS aktivitesinin kontrolündeki esas mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, AÖS’de inhibitör ve eksitatör nörotransmisyon sürecinin anlaşılmasını sağlamıştır. İnhibitör nörotransmitter olarak en büyük rolü nitrik oksit (NO) oynarken, karbonmonoksit (CO), vazoaaktif intestinal polipeptid (VIP), adenozin, kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ve adenozin-3-fosfat (ATP) diğer inhibitör mediyatörlerdir. Asetilkolin (ACh), gastrin, P maddesi ve taşıkininler ise eksitatör nörotransmitterlerdir. AÖS duyuşal ve motor lifler aracılığıyla uyarılır ve duyuşal bilgi hem spinal hem de vagal duyuşal afferentler tarafından beyne iletilir. AÖS’ye giden vagal efferentler (motor nöronlar) ise vagusun dorsal motor çekirdeğinde, inhibitör ve uyarıcı miyenterik motor nöronlarla sinaps yapar. Düz kası doğrudan uymarmazken, NO aracılığıyla AÖS gevşemesine aracılık eder. Ancak yapılan hayvan çalışmalarında vagal uyarı ile, AÖS’nin ilk olarak gevşediğı ve ardından bir kasılma cevabı alındığı gösterilmiştir (De Man vd., 1991; Farré & Sifrim, 2008; Kawahara vd., 1997; Rattan S, 1986; Uc vd., 1999).

Gastrointestinal motor fonksiyon bozukluğı olan hayvan modellerinde yetersiz bir H₂S üretimi olduğı tanımlanmıştır (Jimenez vd., 2017). Bu etkilerin altında yatan etki mekanizmaları tam olarak tanımlanmamış olmasına rağmen, birkaç iyon kanalı ile ilişkili olabileceğı düşünölmektedir. Sıçan gastrik pilorik sfinkter dokusunda yapılan bir çalışmada, H₂S donörü NaHS’in neden olduğı gevşemenin K_{ATP} kanalları antagonisti glibenklamid ile tersine çevrildiğı gösterilmiştir (Medeiros vd., 2012). İnsan ve sıçan kolon dokularında yapılan çalışmalarda hem ATP (K_{ATP}) hem kalsiyum bağımlı potasyum (K_{Ca2.2}/K_{Ca2.3}; SK_{Ca}) kanallarının düz kas hiperpolarizasyonuna katkısı olabileceğı gösterilmiştir (Fiorucci vd., 2005; Medeiros vd., 2009). Ratlarda korpus kavernoşum kesitleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise, Kv (voltage bağımlı) kanal antagonisti 4-AP (aminopiridin) ve non-selektif K kanal antagonisti TEA (tetraetilamonyum) varlığında L-Sistein’in indüklediğı gevşemenin azaldığı gözlenmiştir (Abd Elmoneim vd., 2017). Yine çeşitli gastrik düz kas çalışmalarında, H₂S uygulanması ile oluşun gevşetici etkiler voltage bağımlı potasyum kanalı (Kv) blokörü 4-AP ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (Gallego vd., 2008; Gil vd., 2011). Bu veriler H₂S’in etki mekanizmasının K⁺ kanalları ile ilişkili olduğunu düşöndörmektedir. Ayrıca farelerde mide fundusu üzerinde yapılan bir çalışmada, gastrik düz kas hücrelerinde H₂S ve NO’nun endojen olarak üretildiğı ve birlikte salındıkları gösterilmiştir (X. Meng vd., 2017).

Bu çalışmalardan hareketle H₂S tarafından indüklenen AÖS üzerindeki inhibisyon yanıtıyla ilişkili mekanizmaların katkısını araştırmayı planladık. Bu amaçla NO-bağımlı ve NO-bağımsız EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine L-Sistein, H₂S donörünün ve H₂S sentez inhibitörlerinin etkisine potasyum kanal blokörlerinin katkısı araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Özefagus Anatomi ve Histolojisi

Özefagus, boyunda yutak ile karında mideyi birbirine bağlayan 25-30 cm uzunluğunda, keratinize yassılaştırmış epitel hücrelerinden oluşan, krikofaringeal kastan başlayıp özefagus-mide bileşkesinde sonlanan tüp şeklinde bir organdır (Que, 2015). Normal bir insanda anatomik pozisyonda yutaktan özefagusa geçiş, 6. servikal vertebranın (C6) alt hizasında olup mide içinde sonlandığı yer ise 11. torasik vertebra (Th11) hizasındadır. Özefagus'un boyu, yaşa, cinsiyete ve kişinin boy uzunluğuna göre değişmektedir. Endoskopi ile yapılan ölçümlerde kesici dişlerden mide kapakçığına kadar olan özefagus uzunluğunun erkeklerde ortalama 38-40 cm, kadınlarda ise 35-38 cm olduğu görülmüştür (Maevsky & Watson, 2009).

Özefagus, nefes borusu ve kalbin arkasında, omurganın önünden ve diyaframdan geçerek mideye girer (Bains vd., 2021; Rizvi vd., 2021). Genel olarak vücutta orta hatta ilerler ancak aortanın arkasından geçerken sola ve öne doğru yönlenmiştir. Özefagus servikal, torakal ve abdominal olmak üzere üç anatomik bölümden oluşur. 6. servikal vertebra ile 1-2. torakal vertebralar arasındaki kısım servikal özefagus olarak (C6-Th1), 1-2. torakal vertebralardan başlayıp diyaframdan hiatusa kadar uzanan kısım yaklaşık 20 cm uzunluğunda torakal özefagus olarak (Th1-Th10) tanımlanır, son karın bölümü, diyaframdan midenin fundusuna kadar uzanan 2-5 cm lik kısım ise abdominal özefagus olarak (Th10-Th11) tanımlanmaktadır (Chaudhry & Bordoni, 2021).

Özefagus boyunca üç darlık bölgesi bulunmaktadır (Rosen & Winters, 2021). Özefagusun ve tüm gastrointestinal sistemin en dar yeri olan birinci darlık özefagusun hemen başladığı yerdedir. İkinci darlık ise özefagusun sol ana bronşu çaprazladığı yerdedir. Bu darlık bronş basısına bağlı olarak gelişmektedir. Üst kesici dişlerden 24-26 cm uzaklıktadır. Üçüncü darlık ise kesici dişlerden 40-44 cm uzaklıkta, özefagusun torakstan abdomen geçişi sırasında diyafram hizasındadır (Jeffrey A.H, 2000). Bu bölgeye alt özefagus sfinkteri (AÖS) adı verilmiştir. Özefagusun üst ve alt yemek borusu sfinkteri olmak üzere iki fonksiyonel sfinkteri vardır. Üst özefagus sfinkteri (ÜÖS), yutağın özefagusa geçişinde bulunur. ÜÖS, normalde kasılmış bir pozisyonda

kapalı, dairesel bir kas dokusu demetidir. Yutma sırasında kaslar geçici olarak gevşer ve yiyecek, içecek, mukus ve tükürük şeklindeki maddelerin yemek borusuna geçişine izin verir. Ayrıca yutağa geri akışı önleyerek, aspirasyon riskini azaltır (Chaudhry & Bordoni, 2021; Rosen & Winters, 2021).

Özefagusun mukoza, submukoza, müsküler tabaka ve adventisya olmak üzere dört histolojik katmanı vardır.

Mukoza

Özefagusun en içteki tabakasıdır. Orofarinks mukozasının devamı olup kalın, keratinize olmayan (yumuşak), çok katlı yassılaştırmış epitelden oluşur.

Submukoza

Gevşek bağ dokusudur. Özefagusun en sağlam tabakasıdır. Özefagus damar sistemi, zengin arter, ven plexusu, sempatik ve parasempatik sinir liflerinin oluşturduğu innervasyon ve lenfatiklerin çoğunu içermektedir. Muköz bezler de submukozada yerleşmiştir. Bu katmanda, öncelikle Gİ sekresyonları düzenleyen submukozal plexus bulunur.

Özefagusun Kas Tabakası

Bu katmanın düz kasları içte dairesel kas, dışta uzunlamasına kas katmanları halinde düzenlenmiştir. Proksimalinde çizgili kas liflerinden oluşup, orta kısımlarda çizgili ve düz kas liflerine, distalinde ise tamamen düz kas liflerine geçiş yapan katmandır. Bu katmanda, kas kasılmalarını düzenleyen miyenterik plexus bulunur.

Adventisya

Müsküler tabakanın hemen üstünde bulunan gevşek bağ dokusunu oluşturan, diyaframın üstündeki adventisya katmanı, özefagusun en dış tabakası olarak özefagusu bitişik yapılara bağlar (Eşrefoğlu M., 2016; Rishniw vd., 2011; Rosen & Winters, 2021; Ross MH, 2011).

Gastrointestinal sistemdeki çoğu yapının aksine özefagusta zar katmanı yoktur (Rosen & Winters, 2021). Özefagus dahil tüm gastrointestinal sistem boyunca iç

mukoza tabakası, içte dairesel kaslardan ve dışta uzunlamasına kaslardan oluşan bir kas tabakası demetinden oluşur (Shields vd., 1994). Özefagus ve kolonda yapılan son çalışmalarda, peristaltik refleks ile iki kas tabakasının eşzamanlı olarak kasılma-gevşemesi ilişkisi araştırılmıştır (Ravinder K. Mittal vd., 2006).

İki kas tabakasının eş zamanlı kasılması özefagus duvarının sertliğini artırarak kas lifleri yoluyla kasılmayı güçlendirerek özefagus içeriğinin ittirilmesine yol açar; uzunlamasına kas kasılması ile distal özefagus duvarının incelmeye sonucunda içeriğin özefagus içinde barınması için alan oluşturur. Çalışmalardan hareketle, yutma sırasında özefagusun distalinde bulunan inhibitör nöronların aktivasyonu ile NO ve VIP gibi inhibitör nörotransmitterlerin salınması sonucu alt özefagus sfinkterinin gevşemesine neden olduğu bilinmektedir.

Alt özefagus sfinkteri (AÖS) mide ile özefagus arasında bulunan yüksek basınç bölgesi olarak mide içeriğinin özefagusa reflüsünü engelleyen önemli bir oluşumdur.

2.2. Alt Özefagus Sfinkteri (AÖS)

AÖS'nin özefagusta varlığı, yıllardır devam eden bir tartışma konusu olmuştur. Bununla birlikte özefagus-mide bileşkesinde bir basınç bariyerinin olması gerektiğine dair genel bir kanı mevcuttu. Yapılan anatomik çalışmalarda, yemek borusunun alt ucunda sfinkter benzeri bir yapı veya bir kas kalınlaşmasına rastlanmadı. Daha sonra yapılmış manometrik çalışmalar sonucunda, özefagus-mide bileşkesinde yüksek bir basınç bölgesi olarak yutma sırasında gevşeyen, fonksiyonel AÖS'nin varlığı tanımlandı (Ingelfinger, 1971; R K Mittal, 1990).

2.2.1. AÖS Anatomisi

Alt özefagus sfinkteri (AÖS), yemek borusunun mide ile birleştiği kısımda yüksek basınçlı, özelleşmiş, bazal tonusu olan 2.5-4.5 cm uzunluğunda farklı kasların birleşimi olan bir kas bölgesidir. AÖS'nin üst kısmı diyafram boşluğunda yer alırken, alt kısmı karın içindedir. Bu seviyede iç organları çevreleyen karın zarı ve fibröz bağ dokusu tarafından örtülür. Özefagus sonlandığı kısım ile mide kapısı arasında, mide içeriğinin özefagusa geri akışını önlemede bir kısaç görevi gören keskin bir His Açısı oluşur. His açısı, normalde yaklaşık 55 derecedir. Açının büyümesi gastroözefagiyal reflü hastalığı (GÖRH) sıklığını ve miktarını arttırır (Hershcovici vd., 2011).

Alt özefagus sfinkteri, yemek borusuna benzer şekilde dairesel ve uzunlamasına kas tabakalarından oluşur. Dairesel kas tabakasının varlığı sebebiyle anatomik olarak asimetriktir. Kas tabakaları, özefagus-mide bileşkesinin 10 mm üzerinde ve 25 mm uzunluğunda bölünerek sağda kısa enine kas lifler (U şeklinde tamamlanmayan halkasal yapı) ve solda eğik lifler (midenin daha büyük eğriliği) oluşturur (Liebermann-Meffert vd., 1979; R. Mittal, 2011). Sağ taraftaki dairesel halkalar kanca lifler olarak adlandırılan yarım daire biçimli C-şekilli halkalardır. Sol taraftaki askı lifleri de yarım daire halkaları ile birleşerek eğri bir yönelim gösterir. Bu lifler arasındaki fonksiyonel farklılıklar, sol tarafta daha yüksek basınç ile AÖS'de asimetrik bir basınç oluşmasından ve daha fazla kolinerjik yanıt oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Liebermann-Meffert vd., 1979; R. Mittal, 2011; Ravinder K. Mittal vd., 2017; Preiksaitis vd., 1994).

L-tipi kalsiyum kanalları ağırlıklı olarak kanca kas liflerinde bulunur; bu bölgesel farklılıklar, AÖS'nin kasılabilirliği ile farklı lif tiplerinin ilişkisini açıklamaktadır (Muinuddin, Kang, vd., 2004; Muinuddin, Neshatian, vd., 2004). AÖS'nin her iki kas lifi dopamin, fenilefrin ve izoprenaline karşı farklı derecede duyarlılığa sahiptir (Tian vd., 2004).

Alt özefagus sfinkteri düz kasları sfinkterin sıkıca kapalı kalmasına yardımcıdır. AÖS'nin açılması düz kasların gevşemesi ile olur, ancak AÖS'de gevşetici kas bulunmaz. Direkt inhibitör sinyaller etkisiyle, düz kaslar gevşeyerek sfinkterin açılmasına ve gıdaların geçişine izin verir.

Alt özefagus sfinkteri, radyografik olarak incelendiğinde, 'vestibül' alanı olarak veya gevşediğinde yutma sırasında görülen lümen genişlemesi olarak tanımlanmıştır. Manometri ile incelendiğinde, yemek borusunun mideyle birleştiği yerde bulunan, iç ve dış kaslardan oluşan yüksek basınç bölgesi olarak tanımlanmıştır (Hershcovici vd., 2011).

Bu fonksiyonel oluşumun esas işlevi, mide içeriğinin yemek borusuna kaçmasına engel olmak ve yutma sırasında yemek pasajını mideye göndermektir.

2.2.2. AÖS Motor Nöronal Anatomisi

Alt özefagus sfinkteri, hem parasempatik (vagal) hem sempatik sistemler tarafından afferent (duyusal yol) ve efferent (motor yol) lifler aracılığıyla innerve edilir. AÖS'den beyne duyusal bilgi, hem spinal hem de vagal duyusal yollar tarafından iletilir (R. K. Goyal & Rattan, 1975; Hornby & Abrahams, 2000). Spinal afferentlerin hücre gövdeleri nosiseptif uyarıyı iletirken, vagal afferentler ağrılı olmayan bilgileri beyne iletir. Spinal afferentlerin hücre gövdeleri T1-L3 seviyesinde dorsal kök gangliyonunda bulunmaktadır (Collman vd., 1992). Vagal afferentler (duyusal nöronlar) çoğunlukla arka beynin tractus solitarius çekirdeğinde sinaps yapar. Bu çekirdeğin nöronları, vagusun dorsal motor çekirdeği ve özefagus gövdesinin düz kas kısmı ile bağlantılıdır. Özefagusun çizgili kasını innerve eden motor nöronları ise nükleus ambiguusun rostral kısmında bulunmaktadır (Collman vd., 1993). AÖS'ye giden vagal efferentler (motor nöronlar) ise vagusun dorsal motor çekirdeğinin preganglionik liflerinden kaynaklanır.

İçsel aktiviteye sahip olan myenterik pleksustaki inhibitör ve uyarıcı motor nöronlarla sinaps yapan motor nöronlar düz kası doğrudan innerve etmez. Bunun yerine NO aracılığıyla AÖS gevşemesine aracılık eder. AÖS gevşemesini düzenleyen, traktus soliter çekirdeği ve dorsal motor çekirdek (DMN), arka beynin dorsal vagal kompleksini oluşturur. Dorsal motor çekirdekteki nöronlar, inhibitör veya uyarıcı motor nöronlarla sinaps yapıp yapmamalarına göre dağılır (Rossiter vd., 1990). Parasempatik afferentler, DMN’de ortaya çıkar, enterik sinir sistemi myenterik pleksusuyla sinaps yapar. DMN’nin rostral kısmından kaynaklı uyarıcı sinirler ve kaudal kısmından kaynaklı inhibitör sinirler ile parasempatik sistem uyarıcı ve inhibitör nöronal gövdeleri innerve edilmektedir (Hyland vd., 2001; Rogers vd., 1999; Rossiter vd., 1990). Buradan hareketle intragastrik basınç ve AÖS’nin, iki farklı bölgede bulunan vagal efferent nöronlar aracılığıyla uyarıcı ve inhibe edici kontrolü sağlanmaktadır. Bu etkilerin her ikisi bilateral vagotomi ile bloke edilebilmektedir (Rossiter vd., 1990).

Efferent nöronlar ve inhibitör enterik nöronlar arasındaki sinaptik iletim, nikotinik ve muskarinik reseptörler aracılığıyla ağırlıklı olarak kolinerjiktir (R. K. Goyal & Rattan, 1975). Efferent sempatik yolun nöron gövdeleri T6-T10 spinal segmentte bulunur, aksonları splanknik sinirler aracılığıyla karın boşluğunda bulunan gangliyonlarına iletilir. Pregangliyonik nöronları kolinerjik olup, noradrenerjik postgangliyonik nöronlarda bulunan ACh nikotinik reseptörleri aktive eder. Bu adrenerjik lifler, doğrudan veya enterik motor nöronlar aracılığıyla AÖS düz kasını innerve edebilir (Papasova, 1989). Splanchnik sinirlerin uyarılması, adrenerjik nöronların aktivasyonu ile AÖS’yi gevşeterek β -adrenerjik inhibitör etkiler ortaya çıkarır (Blackshaw vd., 1997).

Uyarıcı impulslar, asetikolin ve taşikininler (P maddesi, nörokinin A/B), muskarinik M2 ve M3 reseptör agonistleri, gastrin etkisiyle kolinerjik aracılıyken; inhibitör impulslar ise VIP, pürinler (ATP), nikotin, β -adrenerjik agonistler, dopamin, kolesistokinin (CCK), sekretin, CGRP, adenosin ve CO’nun etkisiyle nitretrjik aracılıdır.

Hem uyarıcı hem inhibe edici sinir liflerin uyarımını içeren vagus sinir lifleri, deneysel protokollerde elektrik ile uyarım AÖS’de doza bağlı olarak gevşemeye

neden olur (R. K. Goyal & Rattan, 1975; Paterson vd., 1992). In vitro kas şeritleri üzerinde yapılan çalışmalar, vagus sinir uyarılmasının her zaman bir kontraksiyonun izlediği AÖS gevşemesi ile sonuçlandığını ve inhibitör etkinin baskın olduğunu ortaya koymuştur (Blackshaw vd., 1997; Chang vd., 2003; Kawahara vd., 1997; Rattan S, 1986).

Birçok farklı türde yapılan çalışmalarda, EAU, vagal sinir uyarısına veya yutmaya bağlı AÖS gevşemesinin NOS veya NO/sGMP yolu inhibitörlerinin kullanımı ile bloke edildiği gösterilmiştir (Sivarao vd., 2001; Yamato vd., 1992).

2.2.3. AÖS Bazal Tonusu

Alt özefagus sfinkteri, miyojenik tonusa sahip, parasempatik ve sempatik sinir sistemi tarafından modülasyonu ile bazı nörohumoral maddeler tarafından da modüle edilen distal özefagus dairesel düz kasının önemli bir parçasıdır. AÖS'nin miyojenik tonusu, çeşitli nörohormonal etkiler tarafından da modüle edilir. İn-vivo olarak incelendiğinde, inhibitör ve uyarıcı sinirler AÖS basıncına tonik bir etki gösterir.

Inhibitör ve uyarıcı sinirler tarafından salınan birçok hormon ve nörotransmitter, AÖS basıncını değiştirebilir. Nikotin, β -adrenerjik agonistler, dopamin, CCK, sekretin, VIP, CGRP, adenozin, prostaglandin E, nitratlar ve fosfodiesteraz-5 inhibitörleri gibi nitrik oksit donörleri AÖS basıncını düşürür. Muskarinik M_2 ve M_3 reseptör agonistleri, α -adrenerjik agonistler, gastrin, P maddesi ve prostaglandin F-2 α AÖS kasılmasına neden olur (Raj K. Goyal & Chaudhury, 2008).

Normalde, istirahat halinde kasılı (kapalı) durumdadır ve AÖS basıncı, intragastrik basınca bağlı olarak 15–30 mmHg arasında bir tonik basınç oluşturur, gün içerisinde değişkenlik gösterebilir (Richter vd., 1987). Mide-özefagus bileşkesinde bulunan bu yüksek basınç bölgesi; AÖS düz kası ile özefagus düz kası arasındaki fark, artmış bazal tonusun varlığıdır. AÖS bazal tonusu özofago-gastrik bileşkedeki artan basınca önemli ölçüde katkıda bulunur; bununla birlikte, AÖS çevresindeki krural diyaframın kasılması, özellikle inspirasyon sırasında veya intraabdominal basıncın arttığı dönemlerde önemli işlev görür (Pandolfino vd., 2006).

Özefagus ve mide arasında, alt özefagus sfinkteri ve krural diyafram düz kaslarının kombinasyonu, yüksek bir basınç bölgesi oluşturur. AÖS'nin proksimal 2 cm'sini çevreleyen ve dış sfinkteri olarak düşünülen krural diyafram, özefagusa ait bir bağ ile AÖS'ye bağlanarak sfinkterin kasılma-gevşeme gücünü artırır. Solunum sırasında bu iki yapı birlikte hareket ederken, peristaltizm ve geçici AÖS gevşemesi (Transient LES relaksasyonu, TLESR) sırasında ayrılabilceği anlamına gelir (Ravinder K. Mittal, 2016).

Krural diyafram, yutma, kusma ve gastroözofagiya reflü bariyerine katkıda bulunma gibi gastroözofagiya fonksiyonlarda da rol oynar. İstirahat durumunda diyafragmatik krura, alt özefagus sfinkteri, karın içi özefagus kısmı ve his açısının oluşturduğu gastroözofagiya bileşke bir anti-reflü bariyeri görevi görerek mide içeriğinin özefagusa reflüsünü önler (Dilek, 2012).

Sağlıklı bireylerde AÖS basıncı, yemekten sonra ve geceleri en yüksek düzeydedir. Reflü özofajiti olan hastaların AÖS dinlenme basıncı, sağlıklı kontrol veya erozif olmayan reflü hastalığı (NERD) olan hastalardan önemli ölçüde daha düşüktür ve AÖS uzunluğu da daha kısadır (Zentilin vd., 2002).

Alt özefagus sfinkteri basıncı, uyarıcı kolinerjik sinirler, inhibitör nitrejik sinirler ve düz kasların miyogenik tonusunun kombinasyonuna bağlıdır. Miyogenik tonus, AÖS'deki düz kas hücrelerine özgü olarak sfinkterin tonik kasılmasından ve bazal tonus oluşumundan sorumludur. AÖS düz kas hücreleri, özefagus gövdesi düz kas hücrelerinden birkaç açıdan farklıdır. AÖS hücrelerinin daha fazla depolarize olması, voltaj kapılı kalsiyum (Ca_v) kanallarının ekspresyonunun artışı ile spontan spike-benzeri aksiyon potansiyelleri oluşturması ve tonus artışıyla sağlanmaktadır. AÖS'nin kanca lifleri, esas olarak miyogenik tonusun düzenlenmesini sağlar ve kalsiyum kanallarının büyük kısmı burada bulunur. AÖS'nin askı lifleriye vagal sinirlerin kontrolü altındadır ve büyük oranda kolinerjik ve nitrejik kanallara sahiptir (Ravinder K. Mittal & Goyal, 2006; Tian vd., 2004). Bu nöronal düzenleme, AÖS'de sağ taraftaki liflerin daha fazla katkıda bulunduğu asimetrik bir kasılma paterni oluşturur. Sol taraftaki lifler ise daha çok kasılma/gevşeme mekanizması ile ilişkilidir. Ayrıca AÖS hücreleri, temel tonusu oluşturmaya yardımcı aktin, hafif zincirler gibi

yapısal, kasılma proteinlerinin ekspresyonuna da sahiptir ve sfinkter kasının tonik davranışına katkıda bulunur (Raj K. Goyal & Chaudhury, 2008).

Alt özefagus sfinkteri tonusu, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ve kasılma aparatının Ca^{+2} duyarlılığının kontrolü ile miyojenik olarak düzenlenir. L-tipi Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu, Ca^{+2} konsantrasyonu ve hassasiyetini artırarak miyojenik tonusun korunmasına katkıda bulunur (Bai vd., 2018; Kovac vd., 2005).

Miyojenik tonusun ortaya konması, AÖS'nin parasempatik (vagus) ve sempatik sinirler tarafından inhibisyonunun yanı sıra uyarılma mekanizmasının daha iyi araştırılmasına yol açmıştır. AÖS tonusu eksitator ve inhibitör vagal yollarla nörojenik olarak düzenlenir. Eksitator vagal yolak kolinerjik nöronlar aracılığıyla, inhibitör vagal yolak non-adrenerjik/ non-kolinerjik nöronlar aracılığıyla düzenlenir. Uyarıcı kolinerjik sinirler, asetilkolin salgılayarak düz kası aktive eder ve AÖS'nin tonik kasılmasını arttırmırlar. Nitrojenik sinirler ise NO salgılayarak inhibisyonu destekler. Bu mekanizmalar koordineli olarak gerçekleştiğinden kasılma, gevşemeye baskındır. Bu yüzden tamamen sinir iletimi kesilse bile AÖS dokusu miyojenik tonus nedeniyle kasılı halde kalır.

Yutma fonksiyonu, özefagus distansiyonu ve vagus sinir uyarımı kaynaklı veya geçici AÖS gevşemeleri nedenli olmak üzere in-vivo tüm AÖS gevşeme türleri, AÖS'nin oral yönde hareketi ile ilişkilidir (Pandolfino vd., 2006). AÖS'nin oral yönde mekanik olarak çekilmesi ile inhibitör motor nöron aktivasyonu aracılı sfinkterin gevşediği bulunmuştur (Dogan vd., 2007). Yine farelerde yapılan bir çalışma, bir nöromusküler kas gevşetici olan rokuronyum tarafından uzunlamasına kas kasılmasının engellenmesi ile AÖS gevşemesinin ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (Jiang vd., 2009).

2.3. Hidrojen Sülfür (H₂S)

Hidrojen sülfür (H₂S) kötü, çürük yumurta kokusu ile ayırt edilen yanıcı, uçucu ve suda çözünebilen bir gazdır. Nörotoksik ve çevresel bir toksik gaz olarak bilinen H₂S'in fizyolojik önemi, Abe ve Kimura tarafından yeni bir nöromodülatör olarak adlandırılmasıyla ortaya konmuştur (Abe & Kimura, 1996). Bu çalışma H₂S'in endojen üretim ve sinyalleme kapasitesinin aydınlatılması açısından dönüm noktası olmuştur. Daha sonraki hayvan çalışmaları endojen mediyatör olarak, hücre proliferasyonu, apoptoz, enflamatuvar süreçler, hipoksi, kardiyoprotektif etkiler ve nöromodülasyon gibi birçok fizyolojik ve patolojik sürece katılımını ortaya koymuştur (Olas, 2015; Paul & Snyder, 2015).

Hidrojen sülfürün, hücresel sinyal mekanizmalarının ve endojen sentez enzimlerinin biyodağılımının araştırılması ile gaz-transmitter olarak endojen sinyal molekülü olduğu bulunmuştur. Gaz-transmitter terimi Wang tarafından, bileşiklerin standart sıcaklık ve basınçtaki gaz halinin yapısı olarak ifade edilmiştir (R. Wang, 2002). Ayrıca H₂S'in, nöromodülatör etkili NO ve CO gibi önemli bir gaz-transmitter olduğu ve endojen sinyal molekülü rolü oynadığı kabul edilmiştir (R. Wang, 2003). Buradan hareketle H₂S'in fizyolojisini ortaya koymak üzere bitki ve hayvan modelleri kurulmuş, çeşitli organ ve sistemlerde biyolojik etki mekanizmalarının araştırılması ile dikkat çeken bir konu haline gelmiştir.

Son yirmi yılda, H₂S'in fizyolojik rolü hakkında çalışmalar az olmasına rağmen, bakteri ve memelilerde endojen varlığına ilişkin birçok araştırma yapılmıştır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda H₂S'in, oral mikrobiyotanın düzenlenmesinde sorumlu olduğu ve periodontal inflamasyonla ilişkili olduğu ve bağırsak mikrobiyotasındaki gazın bir bileşeni olduğu bulunmuştur (Suarez vd., 1997; Willis vd., 1999).

Birçok araştırmacı biyolojik doku ve sıvılarda endojen H₂S düzeyini ölçmeye çalışmıştır. En yaygın kullanılan iki tahlil yöntemi, metilen mavisi ile ölçüm ve sülfür duyarlı elektrotlar ile ölçümdür. Metilen mavisi ile ölçüm metodunda, H₂S'in bir metal (genellikle çinko) ile asidifikasyonu ve N, N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) boyası ile reaksiyonu sonucu oluşan metilen mavisi spektrofotometrik olarak ölçülür. Sülfür duyarlı elektrotların kullanıldığı bir çalışmada, insan serumunda H₂S

konsantrasyonunun yaklaşık 34 μM düzeyinde olduğu öne sürülmüştür (Y. H. Chen vd., 2005). Ancak bu yöntemlerle serbest H_2S ile HS^- ve S^{2-} iyonlarının da ölçülmesi nedeniyle H_2S 'in mutlak konsantrasyonunun ortaya koyması açısından eksik kalabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple gaz kromatografisi ile ölçüm yapılan çalışmalarda, fare plazmasında H_2S konsantrasyonunun 15 nM düzeyinde olduğu öne sürülmüştür (Levitt vd., 2011). İn vitro organ banyosu ve hücre kültürü çalışmalarında ise, H_2S 'in 100 μM altındaki konsantrasyonlarının, H_2S 'in fizyolojik konsantrasyonları ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Furne vd., 2008).

Gazotransmitterler, organizmada çeşitli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamalarının yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda toksik etkilere neden olabilmektedir. 100 ppm'den daha yüksek H_2S konsantrasyonlarına veya daha düşük seviyelere sürekli maruziyet hızlı koku alma yorgunluğu ile sonuçlanır (Hartle & Pluth, 2016). 20 ppm kadar düşük H_2S konsantrasyonları göz ve akciğer tahrişine neden olurken, 700 ppm veya daha yüksek seviyeler bilinç kaybı, solunum yetmezliği ve ölümle sonuçlanabilir (Hughes vd., 2009). Tarım, petrol ve kanalizasyon işlerinde çalışan işçilerde H_2S 'e maruziyet sonucu, endüstriyel ortamda zehirlenmeler gözlenmiştir. Buradan hareketle H_2S insanlar için toksiktir ve yüksek miktarlarda H_2S 'e (>500 ppm) akut maruziyet ölüm ile sonuçlanabilir (Reiffenstein vd., 1992).

H_2S ile ilgili literatürün büyük kısmı, endüstriyel zehirli gaz olarak petrol ve kağıt ürünlerinden uzaklaştırılması vb. konularda yoğunlaşmıştır. H_2S 'in hayvanlardaki fizyolojik etkisini araştıran biyolojik çalışmada, H_2S gazının cilt yoluyla absorpsiyonu veya doğrudan mide ve rektuma uygulandığında oluşan letal etkileri ilk defa ortaya konmuştur (Chaussier, 1908). Geçen yüzyıl boyunca H_2S 'in çeşitli türlerde, farklı hücre, doku veya organlarda toksikolojik etkilerinin incelendiği yüzlerce makale yayınlanmıştır. Bu gaz, hidrojen siyanüre (HCN) benzer şekilde, mitokondriyal sitokrom C oksidaz enziminin inhibisyonu mekanizması ile toksik bir molekül olarak kabul edilmiştir (Nicholls, 1975).

2.3.1. H₂S'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Hidrojen sülfür, kaynama noktası yaklaşık -60°C olan renksiz, keskin ve gaz halinde bir moleküldür. H₂S suda yüksek çözünürlüğü olan zayıf bir asittir, genellikle nötr moleküler formda (H₂S) bulunur. 37°C 'de pK_{a1} değeri 6,76 ve pK_{a2}>12 ile fizyolojik pH'ta H₂S 'in yaklaşık %18,5'i çözünmeden kalır. Doymuş sulu bir H₂S çözeltisinin, H₂S'in zayıf asidik yapısı nedeniyle oda sıcaklığında konsantrasyonu 0.11 M ve pH'ı yaklaşık 4.0'tür. (pK_{a1} = 6.98) (Y. H. Liu vd., 2011; Vorobets vd., 2002)

H₂S hidrolizasyonu ile kolayca hidrosülfür ve sülfür iyonları verir:



Vücut sıcaklığında (37°C'de) doymamış sulu çözeltisindeki toplam H₂S'in büyük kısmı, anyonik sülfür (HS) biçiminde bulunur. Yüksek pH'ta HS'in sülfid anyonuna (S²⁻) daha fazla ayrışarak H₂S meydana gelir, bu nedenle (S²⁻), fizyolojik koşullarda ihmal edilebilir düzeydedir. Sulu çözelti içinde hem H₂S hem de HS her zaman bir arada bulunduğundan, hangisinin sinyal süreçlerinde rol oynadığına karar vermek ve etkilerini ayırmak mümkün değildir. Yapılan çalışmalardan hareketle H₂S terimi, ilgili ortamlarda biyolojik olarak serbest H₂S ve HS'in toplamını ifade etmektedir. Önceki çalışmalarda aktif H₂S formunun HS olabileceği öne sürülürken, endojen olarak üretilen H₂S'in fizyolojik etkilerden sorumlu olduğu yeni araştırmalarla ortaya konmuştur (Dombkowski vd., 2004; Hughes vd., 2009).

Hidrosülfür anyonu, oksijen (O₂) varlığında oksidasyona uğrayarak sülfid (SO₃²⁻), sülfat (SO₄²⁻), tiyosülfat (S₂O₃²⁻), politiyonatlar (S_nO_n²⁻) ve polisülfidler (S_x²⁻) ve diğer oksitlenmiş polisülfid türlerine dönüşebilir (K. Y. Chen & Morris, 1972). Bu yeni molekül ağırlıklı persülfidler, sülfür sinyalleşmesinin olası aracıları olarak tanımlanmıştır. Hücresel sinyal süreçlerine aracılık eden, sistein-persülfür (Cys-SSH), glutatyon persülfür ve kükürtlenmiş türleri (Cys-SSnH ve GSSnH) redoks düzenleyicileri olarak kabul edilmiştir (Kimura vd., 2017).

Çok kısa yarılanma ömrüne sahip olan H₂S, lipofilik (yağda çözünürlüğü yüksek) olması nedeniyle plazma membranından kolaylıkla geçebilir (Pushpakumar

vd., 2014). Fakat NO ve CO'ya kıyasla kısmi çözünmesi sebebiyle plazma membranından daha az oranda geçmektedir.

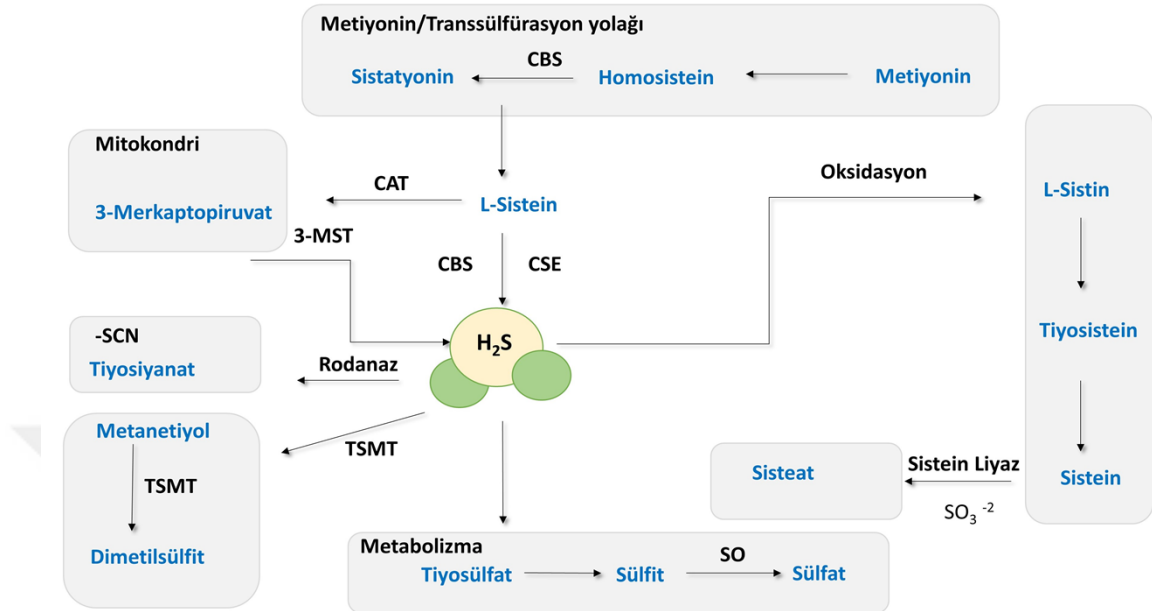
2.3.2. Memelilerde H₂S'in Endojen Sentezi ve Katabolizması

Endojen H₂S'in organizmada ilk defa beyin dokusunda tespit edilmesi, fizyolojik bir rolü olduğu fikrini ortaya koymuştur. Abe ve Kimura tarafından sıçanlarda yapılan çalışmada, beyinde CBS enzimi ekspresyonunun arttığını ve H₂S'in N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerinin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Abe & Kimura, 1996). Bundan kısa bir süre sonra Hosoki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kobay ileum ile sıçan portal ven ve torasik aortunda H₂S üreten enzim CSE'nin eksprese edildiği ve ilk kez H₂S 'in düz kas gevşetici etkisi olduğu bulunmuştur (Hosoki vd., 1997).

Hidrojen sülfür, memelilerde endojen üretimi, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla gerçekleşen bir gaz-transmitterdir (Kolluru vd., 2013). Non-enzimatik sentez basamağı elementel sülfürün H₂S'e indirgenmesi ile oluşmaktadır. İndirgenme reaksiyonu, glukoz oksidasyonu ile oluşan indirgeyici ajanlar, NADH, NADPH ve glutatyon (GSH) ile gerçekleşmektedir. Ancak non-enzimatik olarak sentezlenen H₂S miktarı, enzimatik olarak sentezlenen miktara kıyasla oldukça düşüktür.

Endojen H₂S çeşitli yollar aracılığıyla metabolize olur. Kanda methemoglobin ile kolayca reaksiyona girerek H₂S için metabolik bir havuz görevi görebilen sülfhemoglobini oluşturur. Mitokondri tarafından H₂S oksidasyonu ile ilk tiyosülfata (S₂O₃⁻²) oksitlenir daha sonra sülfite oksidaz enzimi aracılığıyla sülfite (SO₃⁻²) ve sülfata (SO₄⁻²) dönüştürülerek katabolizmaya uğramaktadır. Karaciğer oksidasyonun gerçekleştiği ana organ olmakla birlikte, tüm hücreler H₂S'i oksitleme yeteneğine sahiptir. Son ürün olarak oluşan serbest ve konjuge sülfatlar idrarla atılmaktadır. Diğer metabolik yolak sitozolde gerçekleşen metilasyondur. H₂S, sitozolik tiyol-S-metiltransferaz (TSMT) enzimi ile metantiyol ve dimetilsülfür oluşturmak üzere metilasyona uğrayabilir (Li vd., 2011). Septik şok, hemorajik şok ve pankreatit gibi vücutta yüksek miktarda H₂S oluşumuna neden olan durumlarda da memeli akciğerlerinden H₂S atılımı gerçekleşmektedir. Ancak sağlıklı bireylerde,

akciğer yoluyla atılım idrarla atılıma göre oldukça düşük oranda gerçekleşmektedir (Y. H. Liu vd., 2012).



Şekil 2.1 Memeli hücrelerinde hidrojen sülfürün (H_2S) biyosentezi ve katabolizması (Li vd., 2011).

Kükürt içeren amino asitlerin ve metabolitlerin birbirine dönüşümü, sistein aminotransferaz (CAT), sistein dioksijenaz (CDO) ve sistein liyaz (CL) yoluyla sağlanır. GSSG oksitlenmiş glutatyondur, GSH indirgenmiş glutatyondur, R-SH tiol taşıyan bir ara ürünü temsil eder, SO sülfıt oksidazı temsil eder ve TSMT, tiyol S-metiltransferazı temsil eder.

H₂S'in enzimatik üretimi

Hidrojen sülfür, insan ve memeli dokularında, substrat olarak L-Sistein veya Homosistein kullanılarak en az dört farklı yolak ile endojen olarak sentezlenmektedir. Bunlar a) CBS, L-Sistein üzerinden etki ederek H_2S üretir, b) CSE, sisteinden tiyosistein oluşturarak H_2S üretir, c) CAT, L-Sisteinden 3-merkaptopiruvatı oluşturur ve ardından 3-MST ile H_2S üretir, d) CL L-sisteatı H_2S 'ye dönüştürür (Li vd., 2011). CBS, CAT, CSE ve CL enzimleri için Piridoksal 5'-fosfat (vitamin B6, PLP) bir kofaktör olarak gerekliyken, 3-MST enzimi çinko bağımlıdır. Bu enzimlerden, CBS ve CSE, transsülfürasyon yolunu oluşturur. Transsülfürasyon yolağı enzimleri ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunur, ancak bazı koşullarda çekirdek veya mitokondride

bulundukları bildirilmiştir. 3-MST, ağırlıklı olarak mitokondrilerde bulunur ve CAT ile birlikte H₂S üretir (Shibuya, Tanaka, vd., 2009).

Hidrojen sülfür, vücutta "H₂S sentezleyen enzimler" olan CBS, CSE ve 3-MST'ın desülfidasyonu ile doğal olarak üretilir. Bu sentez yollarının her birinde, H₂S'e katılan kükürt atomu, homosistein veya L-Sisteinin sülfhidril grubundan sağlanmaktadır.

Hidrojen sülfür üretiminin ana kaynağı olan L-Sistein, endojen sentez enzimleri ile trans-sülfidasyon yoluyla desülfidasyona uğramaktadır. Endojen H₂S sentezi, substrat olarak yaklaşık %70 L-Sistein'i, %30 Homosistein'i kullanırken bir başka biyosentetik yola D-sistein'den 3-MST ve D-Aminoasid oksidaz varlığında gerçekleşmektedir (X. Chen vd., 2004; Linden, 2014; Linden vd., 2008; R. Wang, 2012). H₂S'in memeli dokularında endojen sentezinde görevli olan CBS, CSE ve 3-MST enzimleri yaygın şekilde dokulara özgü olarak dağılmıştır. CBS ve CSE enzimlerinin karaciğer, böbrek, kalp, damar, beyin hücreleri ve lenfositler gibi pek çok hücrede eksprese olduğu belirlenmiştir. CBS enzimi santral sinir sisteminde H₂S sentezinde görevli ana enzimken, kardiyovasküler sistemde H₂S sentezinde CSE enzimi önceliklidir (Gutman vd., 2005). Hem CSE enzimi hem de CBS enzimi PLP bağımlıdır ve sitozolde bulunur, PLP'den bağımsız 3-MST enzimi ise mitokondri içinde bulunur (Shibuya, Tanaka, vd., 2009).

Gastrointestinal sistemde H₂S seviyeleri; kalın bağırsaktaki bakteriler ve Gİ yolun hücreleri tarafından endojen sentezi olmak üzere iki kaynaktan sağlanır (Farrugia & Szurszewski, 2014; Linden vd., 2010).

GİS üzerinde yapılan çalışmalarda H₂S sentezinde görevli olan CBS ve CSE enzimlerinin ikisinin de varlığı gastrik mukozada tespit edilmiştir (Fiorucci vd., 2005; Wallace vd., 2007). Gastrointestinal sistemin enterik nöronlar, Cajal interstisyel hücreleri ve epitel hücreleri dahil farklı hücre tiplerinde CSE ve CBS ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Buradan hareketle H₂S'in enterik nöronlardan nörotransmitter salınımı veya düz kas üzerindeki doğrudan inhibe edici etkisine aracılık ettiği düşünülmektedir.

Sistatyonin beta sentaz (CBS)

İlk olarak 1969'da bulunan CBS enzimi, PLP bağımlı reaksiyonu katalizleyerek L-Homosistein veya L-Sisteinden L-Sistatyonin ve H₂S sentezlendiği bulunmuştur (Braunstein vd., 1969).

Yapılan çok sayıda çalışmada böbrek, karaciğer, lenfositler, uterus, plasenta ve pankreas adacıkları gibi birçok organda tespit edilen CBS enzimi (Kaneko vd., 2006; Patel vd., 2009), merkezi sinir sistemindeki baskın H₂S sentaz enzimi olarak kabul edilir. Farelerde yapılan bir çalışmada beyin ve böbreklerde baskın olarak bulunduğu gösterilmiştir (Kabil vd., 2011).

Sistatyonin gama liyaz (CSE)

CBS'ye benzer şekilde, CSE enzimi substrat olarak L-Sistein ve L-Homosisteinden PLP'ye bağımlı reaksiyonun katalizlenmesi ile sırasıyla piruvat ve α -ketoglutarata yıkılarak, amonyak ile H₂S sentezlenmektedir.

Memeli dokularında bulunan CSE enzimi CBS enzimine kıyasla organizmada daha geniş şekilde dağılmaktadır. Kardiyovasküler sistem ve solunum sisteminde yaygın şekilde bulunmaktadır. CSE'nin ekspresyonu torasik aort, portal ven, mezenterik arter ve diğer vasküler yatakların hem düz kas hücrelerinde hem de endotelde gösterilmiştir. Fare ince bağırsak, mide ve pankreası, sıçan rahimi, insan plasenta, miyometriyum, amniyon ve koryon dokularının CSE'yi eksprese ettiği görülmüştür (Ishii vd., 2004; Kaneko vd., 2006; Patel vd., 2009).

Hücre içi Ca⁺² konsantrasyonu ile CSE enzim aktivitesinin ilişkili olduğu bilinmektedir (Asif K. Mustafa vd., 2009). Buradan hareketle yapılan çalışmada düşük hücre içi kalsiyum seviyelerinin CSE enzimi aracılığıyla H₂S sentezini indüklediği, fakat hücre içi kalsiyum artışının CSE aktivitesini baskıladığı bulunmuştur (Mikami vd., 2013). Bununla birlikte, bu düzenlemenin altında yatan kesin moleküler mekanizma halen bilinmemektedir.

3-Merkaptopirüvat Sülfür Transferaz (3-MST)

En son keşfedilen endojen H₂S sentezleyici enzimdir. MST, sitoplazmada ve mitokondride bulunan bir sülfürtransferazdır (Shibuya, Tanaka, vd., 2009). Bu enzim sistemi ile L-Sistein substratı, iki aşamalı bir reaksiyon ile CAT enzimi varlığında 3-merkaptopirüvata (3-MP) dönüşmektedir. CAT, L-Sistein ve α -ketoglutarat arasındaki transaminasyon reaksiyonunu katalize ederek 3-merkaptopirüvat ve L-glutamat üretirken, 3-MST tioredoksin veya dihidrolipoik asit gibi indirgeyiciler varlığında 3-merkaptopirüvatı pirüvat ve H₂S'e dönüştürür (Shibuya, Tanaka, vd., 2009).

3-Merkaptopirüvat sülfür transferaz enzimi, 3-MP'den kendisine bir sülfür atomu aktarır ve bu da persülfür oluşumuna yol açar. Fizyolojik indirgeyici disülfid, tioredoksin ve dihidrolipoik asidin, 3-MST'nin aktif bölgesinde persülfürden H₂S salımında etkili olduğu gösterilmiştir (Mikami vd., 2011).

Son zamanlarda memelilerde yapılan çalışmalarda başka bir 3-MP kaynağı olarak D-Sistein bulundu (Shibuya vd., 2013). D-sistein, peroksizomda yer alan FAD bağımlı peroksizomal enzim D-aminoasit oksidaz (DAO) aracılığıyla 3-MP'ye dönüştürülür. Peroksizom ve mitokondri arasındaki metabolit alışverişi sonucu 3-MP'yi mitokondriye aktarabilir ve burada substrat olarak 3-MST enzimi ile H₂S'e katalize edilir. DAO'nun beyin ve böbrek peroksizomlarında yüksek oranda ifade edilmesi nedeniyle, iki organda da bu H₂S sentez yolunun varlığı ortaya konmuştur (Shibuya vd., 2013). Çalışmalarda bu sentez yolağının, serebellumda serebellar nöronları oksidatif strese koruduğu ve böbreklerde iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarını azalttığı gösterilmiştir (Shibuya & Kimura, 2013).

Ratlarda torasik aortta yapılan çalışmada, 3-MST ve CAT enzimlerinin endotelde lokalize olduğu ve endotel hücrelerinde H₂S sentezinden sorumlu oldukları gözlenmiştir. H₂S'in vasküler endotelden salınan bir düz kas gevşetici olduğu gösterilmiştir (Shibuya, Mikami, vd., 2009).

3-Merkaptopirüvat sülfür transferaz enzimi, CBS ve CSE'ye benzer şekilde, kalp hücrelerinde, karaciğerdeki hepatositlerde ve böbreğin proksimal tübüler epiteli gibi özellikle yüksek aktiviteye sahip birçok dokuda eksprese edilmektedir. Sıçanlarda

yapılan bir çalışmada, 3-MST'nin böbrek, karaciğer, aort ve beyinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Nagahara vd., 1998). Memeli hücrelerinde, esas olarak mitokondride bulunur ve H₂S üretimi burada gerçekleşir. Ayrıca L-Sistein düzeyinin mitokondride sitoplazmaya kıyasla üç kat fazla olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Nagahara vd., 1998).

H₂S'in non-enzimatik üretimi

Endojen H₂S'in bir kısmı non-enzimatik olarak sülfan sülfürden kimyasal indirgeme ile üretilir. Persülfidler (RSSH), hidropersülfidler (RSnH), tiyosülfatlar (S₂O₃⁻²) ve polisülfidler (RSnR, n>2), politiyonatlar (-SO₃-S_n-SO₃) gibi reaktif sülfür türleri ve elemental sülfür (S₈), glikoliz yoluyla glikozun oksidasyonu veya nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz yoluyla fosfoglukonattan sağlanan NADPH ve nikotinamid adenin dinülotid (NADH) gibi eşdeğerlerin varlığında H₂S ve diğer metabolitlere indirgenebilir (Olson vd., 2013).

Endojen H₂S'in moleküler hedefleri, fizyolojik açıdan önemli birçok proteini, kinazları, fosfatazları, tiyoller, polisülfürleri, tiyosülfat/ sülfidler, demir-sülfür küme proteinlerini, çoklu hücrel ve moleküler yanıtları etkileyen transkripsiyonel faktörleri ve antioksidan bileşikler içeren sinyalleme hedeflerini içermektedir. Bu nedenle, H₂S'in sinyal yollarının ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Olas, 2015).

2.3.3. Hidrojen Sülfür'ün Diğer Sistemler Üzerine Etkileri

H₂S'in kardiyovasküler sistemde homeostazın sağlanmasında, kalp ve kan damarları üzerindeki H₂S etkilerini araştırma sonuçlarının önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur. İlk defa Hosoki ve ark. H₂S'in, noradrenalin ile önceden kastırılmış sıçan portal ven ve torasik aortasında konsantrasyona bağlı bir gevşeme cevabına neden olduğunu göstermişlerdir (Hosoki vd., 1997). Sıçan ve fare aortası, insan internal mamaryal arteri gibi damar yataklarında yapılmış çalışmalarda H₂S'in düşük konsantrasyonlarının (10-100 µM) kasılma cevabı oluşturduğu, daha yüksek konsantrasyonlarının (100-1000 µM) ise gevşeme cevabına neden olduğu gözlenmiştir (S. Kubo vd., 2007; Webb vd., 2008). H₂S'in tavşan ve insan izole korpus

kavernozumunda da gevşetici etki gösterdiği ve NO ile erektil fonksiyonun kontrolünde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Di Villa Bianca vd., 2009).

Spontan hipertansiyon modeli oluşturulmuş sıçanlarda, H₂S'in plazma düzeyinin düşük olduğu ve CSE enzim aktivitesinin baskılandığı olduğu gözlenmiştir. Eksojen H₂S uygulamasıyla kan basıncında azalma ve plazma H₂S düzeyleri ve CSE enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Yan vd., 2004).

H₂S'in anti-inflamatuvar etkisinin, endotel lökosit yapışmasının inhibisyonu, inflamatuvar belirteçlerin ekspresyonunun modülasyonu, prostaglandinlerin biyosentezi ve aktif B hücreleri artıran nükleer faktör kappa-hafif zincir (NF-κB) ve nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf-2) gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşim sonucu olduğu varsayılmaktadır. Son çalışmalarda H₂S'in inflamatuvar yanıt sırasında, NF-κB seviyelerinin regülasyonu ile CSE ve CBS enzim seviyelerini korumak için etkili olduğu gösterilmiştir. Ateroskleroz tedavisinde kullanılan statinlerin, Akt sinyalleme sisteminin aktivasyonu ile CSE enzimi transkripsiyonu ve H₂S'i up-regüle ettiği, başka bir inflamasyon modelinde ise bir steroid olan deksametazon kullanımının, NFκB-aracılı CSE ekspresyonunu azalttığı dolayısıyla H₂S aracılı proinflamatuvar yanıtı inhibe ettiği ortaya konmuştur (Y. Wang vd., 2009; Xu vd., 2014).

Beyinde CBS enzimi aracılığıyla sentezlenen endojen H₂S, santral sinir sisteminde birçok fizyolojik fonksiyon göstermektedir. H₂S'in nöromodülatör etkisini nöronal hücrelerde N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonunu arttırarak hipokampusun uzun süreli potansiyalizasyonunun (Long Term Potentiation, LTP) indüklenmesini kolaylaştırmak yoluyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Abe & Kimura, 1996; Kimura & Kimura, 2004).

H₂S aynı zamanda nöroprotektif etkisiyle nöronları oksidatif strese karşı korumaktadır. Mitokondride 3-MST/CAT yolağı aracılığıyla sentezlenen H₂S, reaktif oksijen türevlerini süpüren bir antioksidan olarak görev yapmaktadır (Kimura vd., 2010).

H₂S'in akciğer ve havayolları dokularında, CSE ve CBS enzimleri tarafından sentezlenen önemli bir modölatör olduğu bilinmektedir (P. Wang vd., 2011). Ovalbumin (OVA) ile astım modeli oluşturulan farelerde yapılmış bir çalışmada, akciğer CSE ekspresyonunun down-regüle olduğu, CSE knock-out farelerde, Th2 sitokin (IL-5, IL-13) seviyelerinin yüksekliği ile seyreden solunum yolu inflamasyonunun arttığı görülmüştür. CSE knock-out farelere, ekzojen H₂S uygulanmasının, şiddetli astım semptomlarını ortadan kaldırdığı, bu nedenle astım gelişiminde CSE/H₂S sisteminin koruyucu bir role sahip olabileceği öngörülmüştür (G. Zhang vd., 2013).

Wang ve ark. oluşturduğu, kolesterol, trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein plazma seviyelerinin yüksekliği ile seyreden aterosklerotik fare modelinde, aortta H₂S sentezi ve plazma H₂S konsantrasyon düzeyinin azalması ile bozulmuş H₂S biyosentezi arasındaki ilişki gözlenmiştir (Y. Wang vd., 2009).

Yapılan diğer çalışmalarda, CSE inhibitörü PAG uygulamasının sıçan insülinoma hücrelerinde (INS-1E) insülin salınımını arttırdığı, izole fare pankreas adacıklarında glukozla indüklenen insülin salınımını azalttığı gözlenmiştir (Kaneko vd., 2006; W. Yang vd., 2005).

2.3.4. Hidrojen Sülfür'ün Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri

H₂S sentezinde görevli olan CBS ve CSE enzimlerinin her ikisinin de gastrik mukozada ekspresyonunun ortaya konduğu çalışma, H₂S'in gastrointestinal sistemdeki etki araştırmalarının öncüsü olmuştur (Linden vd., 2008). İnsan kolonu, submukozal ve miyenterik nöronlarda CBS ve CSE'nin ekspresyonu, miyenterik eksternal hücrelerde ise CSE'nin ekspresyonu gösterilmiştir (Hosoki vd., 1997; Linden vd., 2010; Martin vd., 2010; Schicho vd., 2006). Hem CBS hem de CSE enzimi sıçan ve fare kolonunda epitel hücrelerinde ve kaslarda eksprese edilir (Gil vd., 2011; Y. Liu vd., 2013). Tavşan midesi düz kas hücrelerinin de 3-MST ve CSE enzimlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (Nalli vd., 2015). Sıçan, fare ve kobayda CBS ekspresyonu CSE'ye kıyasla baskın görünürken, insan submukozal plexus ve epitelinde bu enzimlerin aynı düzeyde eksprese edildiği ortaya konmuştur (Schicho vd., 2006).

Araştırmalar H_2S 'in gastrointestinal yapılar da, motilitenin regölasyonu, mukozal kan akımını arttırıcı, antinosiseptif, antioksidan, prosekretuar ve gastroprotektif etki gibi birçok fizyolojik etkisi olduğunu göstermiştir (Fiorucci vd., 2005).

Ülser modeli oluşturulmuş sıçanlar da yapılmış çalışmada, gastrik H_2S düzeyi ile CBS ve CSE enzim ekspresyonlarında artış olduğu gözlemlenmiştir. H_2S donörleri ve L-Sistein uygulamasının ülserin iyileşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Wallace vd., 2007). Ayrıca, endojen H_2S 'in antioksidan etkisi ile anti-inflamatuar bir molekül olarak düşünölebileceği ve kolit tedavisinde potansiyel terapötik bir molekül olabileceği düşünölmöştür (Hirata vd., 2011).

Sıçanlar da yapılmış başka bir çalışmada, H_2S donörü olan NaHS'nin sistemik uygulanmasının, gastrik mukozada steroid yapısında olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ)'lerin neden olduğu gastrik mukozal hasarı azalttığı, H_2S 'in gastrik sirkölasyonda fizyolojik bir rolö olduğu ve CSE enziminin NSAİİ'ler için yeni bir hedef olabileceği ileri sürölmöştür (Fiorucci vd., 2005).

Barsak I/R hasarı oluşturulan sıçanlar a, NaHS uygulanmasının, serum ve barsak dokusundaki malondialdehit (MDA) aktivitesinin önemli derecede azaldığı gözlemlenmiştir (Liu vd., 2009). Fare kolon dokusunda maternal ayrılmanın neden olduğu epitel hasar, oksidatif stres ve iltihaplanmaya karşı H_2S 'in koruyucu rolö olduğu tespit edilmiş ve H_2S 'in potansiyel terapötik önemi olabileceği öne sürölmöştür (Li vd., 2017).

Yapılan alışmalar, H_2S 'in gastrointestinal motilitenin regölasyonunda da rolö olduğunu ortaya koymuştur. H_2S 'in tavşan ve kobayda yapılan çalışmalarda, spontan veya ACh'in indökleğiği ileum kontraksiyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Hosoki vd., 1997; Teague vd., 2002). NaHS'nin periton içine uygulandığı in vivo çalışmada ise sıçan kolonunda gevşemeye neden olduğu bulunmuştur (Distrutti vd., 2006).

Gastrik düz kas hücrelerinde yapılmış bir çalışmada ise, H_2S 'in neden olduğu inhibisyona, rho kinaz ve protein kinaz C (PKC) aktivitelerinde azalmanın eşlik ettiği

gözenmiştir. H₂S etki mekanizması ile rho kinaz ve PKC aktivitelerinin inhibisyonu arasında bir ilişki olduğu düşünülmüştür (Nalli vd., 2015).

2.4. Memelilerde NO sentezi ve metabolizması:

On sekizinci yüzyılın sonlarında bir gaz olarak tanımlanan NO, 1980'de ilk defa biyolojik bir ajan olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1987'de vazodilatör etkisi ve NO sentaz (NOS) aracılığıyla endojen olarak sentezi ilk defa ortaya konmuştur (Ignarro, LJ vd., 1987).

Nitrik oksit, tüm dokularda, NOS bağımlı ve bağımsız yollar tarafından sentezlenmektedir (Luiking vd., 2012; Tan vd., 2012). Memelilerde NO, NOS enziminin nöronal nNOS (NOS I), indüklenebilir iNOS (NOS II) ve endotelial eNOS (NOS III) olarak bilinen üç izoformu tarafından endojen olarak üretilmektedir. Genetik olarak farklı olmalarına rağmen, üç izoform da L-arjinin'den kosubstrat olarak moleküler O₂ ve NADPH varlığında NO ve L-sitrüline oksidasyonunu katalize eder. Ayrıca ortamda flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD) ve tetrahidrobiopterin (BH₄) gibi çeşitli kofaktörler bulunmalıdır. Gastrointestinal sistemde gastrik mukozada ise, fizyolojik koşullarda NOS tarafından L-arjinin'den L-sitrüline dönüştürülerek NO sentezlendiği gösterilmiştir (Breuillard vd., 2015).

nNOS'un, kan damarları, solunum yolu, genitoüriner sistem ve gastrointestinal sistemdeki düz kasların otonom sinirlerindeki varlığı, iNOS ekspresyonu, makrofajlar ve nötrofiller gibi birçok immünolojik hücre tipinde tanımlanmıştır. Üçüncü form, eNOS, esas olarak endotel hücrelerinde eksprese edilir, kardiyomiyositler, hepatositler, bağırsak hücreleri, trombositler, nöronlar ve astrositler gibi diğer hücre tiplerinde de varlığı ortaya konmuştur.

Fizyolojik olarak üretilen NO hızlı şekilde metabolize edilir. Memeli hücrelerindeki endojen NO metabolizmasının son ürünleri; NO_x olarak bilinen, nitrit (NO⁻²) ve nitrat (NO⁻³)'tır. Bu son ürünler, memeli dokularında NOS-bağımlı NO biyosentezi yolunu tamamlayıcı NO “depolama havuzları” olarak kabul edilmişlerdir (Lundberg vd., 2008).

2.4.1. NO sinyal yollakları

Nitrik oksit, gastrointestinal sistem boyunca tonus ve motiliteyi düzenleyen, periferik otonomik sinirlerden salıverilen majör non-adrenerjik, non-kolinerjik (NANK) inhibitör mediyatördür (Bennett, 1997; Bult vd., 1990).

Nitrik oksit'in endojen etkileri, siklik guanozin monofosfat (sGMP) bağımlı veya sGMP'den bağımsız fizyolojik sinyal yollaklarının aktive edilmesi ile oluşur. NO'nun gevşeme ve düz kas membranı hiperpolarizasyonu yanıtı ile düşük NO konsantrasyonları (5-10 Nm), guanilat siklazı (GC) aktive ederek, guanozin trifosfatı sGMP'ye dönüştürür. Artmış sGMP düzeyleri, homodimer yapıda bir serin/treonin kinaz olan protein kinaz G'yi (PKG) aktive eder (Berridge, 2014; Bian & Murad, 2014). sGMP'ye bağlı PKG'nin aktivasyonu sGMP'ye bağlı K⁺ kanallarının aktivasyonuna yol açar.

Gastrointestinal sistemde, insan ince bağırsağında yapılan çalışmalar ile NO'nun inhibitör bir nörotransmitter olduğu gösterildi (Stark & Szurszewski, 1992). Daha sonra bu araştırmaları destekleyen insan mide düz kasında yapılmış birçok çalışma da yapılmıştır (Huang vd., 2013; Jin JY, Jin NG, Li Y, 2000; Yu vd., 2003).

2.5. H₂S ve NO ilişkisi:

Nitrik oksit donörlerinin ve nitrik oksit sentaz (NOS) substratlarının, H₂S üreten enzimlerin aktivitesi veya ekspresyonu üzerine etkileri uzun yıllardır araştırılmaktadır (W Zhao & Wang, R, 2002; Weimin Zhao vd., 2003).

Düz kas hücreleri üzerinde yapılmış çalışmalarda NO ve CO gaz transmitterleri gibi, H₂S'in de doğrudan çözünabilir guanilat siklaz (sGC) aktivasyonu yoluyla veya sGMP'ye özgü fosfodiesterazların inhibisyonu yoluyla sGMP düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (Bucci vd., 2010; Christodoulides vd., 1995). Yine başka bir çalışmada H₂S'in hem grubundaki ferrik demiri (+3) ferröz demire (+2) indirgediği, NO'nun sGC'ye bağlanmasını kolaylaştırarak sGMP oluşumunu desteklediği gösterilmiştir (Zhou vd., 2016).

Bazı yazarlar tarafından öne sürülen, NO ve H₂S'in sinyal yolları arasındaki etkileşimler çalışmalar ile gösterilmiş olsa da H₂S'in doğrudan sGMP içermeyen fizyolojik yolağı da kullandığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Bertova vd., 2010; A.K. Mustafa vd., 2011; Sojitra vd., 2012; Whiteman vd., 2006; Yong vd., 2010).

Hidrojen sülfür'ün, CO ve NO'ya benzer fizyolojik etkilerle, kardiyovasküler sistemde vasküler düz kas tonusunun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ve merkezi sinir sisteminde nörotransmitter/nöromodülatör olarak nöronlar üzerinde nöroprotektif etkili olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca bu gazın, düz kasta vasküler fonksiyonun düzenlenmesinde NO ile sinerjistik etkileşim gösterdiği bulunmuştur (Hosoki vd., 1997; RM vd., 2015).

Nitrik oksit etkisinden sorumlu bir diğer önemli sinyalleme yolu S-nitrozilasyondur. Yeni çalışmalar H₂S'in hücrelerde S-nitrozotiyol profilini modüle edebileceğini öne sürmektedir. H₂S ve NO arasındaki etkileşim sonucu, NO ile indüklenen sistein kalıntılarının S-nitrozilasyonu ile H₂S'in biyosentezinden sorumlu enzimlerin artan aktivitesi veya sGMP'ye bağımlı kinazların aktivitesinin artışı ile oluşan NO'nun H₂S'in biyosentezinden sorumlu CSE enzimini uyardığı bilinmektedir.

Tiyol molekülleri ile NO arasındaki etkileşim sonucu, NO ile indüklenen S-nitrozilasyonun bazıları oluşmaktadır. Bir tiyol molekülü olan H₂S, S-nitrozotiyoller ile reaksiyona girerek en küçük S-nitrozotiyol olan tiyonitöz asit (HSNO) oluşturur (Filipovic vd., 2012). Nitrozotiyol (HSNO)'un tanımlanması ile NO ve H₂S'in etkilerinin fonksiyonel benzerliğindeki moleküler temel ortaya konmuştur (Whiteman vd., 2006). HSNO, redoks sensörü ve metabolik aktivitelerin düzenleyicisi gibi özelliklere sahiptir. Hücresel düzeyde metabolize edilerek NO⁺, NO ve NO⁻ salınmaktadır. HSNO, Hücre membranlarını kolayca geçerek hemoglobin gibi proteinler ile etkileşerek etkilerinin ortaya çıkmasını sağlar (Filipovic vd., 2012). H₂S tarafından daha fazla indirgenmesi veya doğrudan yer değiştirme reaksiyonu ile vazodilatör ve kardiyoprotektif etkileri olan, başka bir ara ürün nitroksile (HNO) dönüşmektedir (Fukuto vd., 1992; Paolocci vd., 2001; Yong vd., 2010).

Berenyiova ve ark. sıçanlarda aort ve mezenterik arterde yaptığı çalışmada, önceden kasılmış izole dokularda sodyum sülfürün (Na₂S) NO donörü GSNO

etkileşimi ile oluşan reaksiyon ürünlerinin (Nitroksil (HNO)), her iki bileşiğe göre daha belirgin ve daha hızlı vazorelaksan olduğu gösterilmiştir (Berenyiova vd., 2015).

Zhao ve ark. sıçanlarda yaptığı çalışmada NO donörü sodyum nitroprussid'in ekzojen uygulamasının, farklı dokularda CBS ve CSE ekspresyonunu up-regüle ettiği dolayısıyla H₂S üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Weimin Zhao vd., 2003).

2.6. Potasyum Kanalları:

Potasyum kanalları, iyon kanalları arasında en yaygın bulunan, en fazla alt türe ve çeşitliliğe sahip insan genomunda 90'dan fazla gen ile bir iyon kanalı ailesidir (Gutman vd., 2005; Lawson & McKay, 2006). Gastrointestinal sistem boyunca hücrelerde her yerde çeşitli potasyum kanalları bulunur, nörotransmitter ve hormon salınımı, kalp hızı, insülin salgılanması, nöronal uyarı, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi, düz kas kasılması, hücre içi pH, hücre çoğalması ve sinyal iletimi gibi çok çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynar (Alexander vd., 2015). Hücre membranının yapısında bulunan K⁺ kanalları, uyarılabilir ve uyarılabilir olmayan hücrelerin içine ve dışına K⁺ iyon akışına izin verir. K⁺ kanallarının aktivasyonu, zarı hiperpolarize eden ve hücre uyarılabilirliğini ve kontraktilesini azaltan dışa doğru K⁺ akımları ile ilişkilidir. Dinlenme membran potansiyelinde kapalı durumda olan K⁺ kanallarının çeşitli uyarılarla aktivasyonu, membran hiperpolarizasyonuna ve dolayısıyla membran stabilizasyonuna yol açmaktadır. Bu da uyarıcı uyarılara karşı daha düşük bir duyarlılığa neden olur.

Potasyum kanalları, her alt birimde bulunan transmembran alanlarının (veya a-sarmal) sayısına göre, sırasıyla 6/7, 4 veya 2 transmembran segmenti (6/7TM, 4TM ve 2TM) ile üç sınıfta ayırt edilirler. Mekanik gerilme, pH, sıcaklık, membran voltajı ve ligandlar gibi çeşitli uyarılarla düzenlenmelerine göre de sınıflandırılabilirler (Heitzmann & Warth, 2008).

Yapısal, fonksiyonel özellikleri ve gen ailesine göre K⁺ kanalları dört aileye ayrılır: 1) Kalsiyum ve sodyumla aktive olan potasyum kanalları (K_{Ca/Na},6/7 TM); 2) İçe yönelik doğrultucu potasyum kanalları (K_{IR},2 TM); 3) İki gözenekli alan potasyum kanalları (K_{2P},4 TM); ve 4) Voltaj kapılı potasyum kanalları (K_V,6 TM). Membran

depolarizasyonu (voltage kapılı K^+ (K_V) kanalları) ve sitozolik Ca^{+2} düzeylerindeki artış (Ca^{+2} -bağımlı K^+ (K_{Ca}) kanalları) ile çeşitli uyaranlara yanıt olarak K^+ kanalları açılmaktadır. (Currò, 2016; Gutman vd., 2005; Wei vd., 2005). K_{IR} ve K_{2P} kanallarının aktivasyon mekanizmaları daha az bilinmektedir. Yapısal açıdan K_V , K_{Ca} ve K_{IR} dört alt biriminden oluşan makromoleküler yapılardır. Fakat, K_{2P} kanalları, her bir alt birim iki gözenekten oluşan fonksiyonel homodimerlerdir. Bu kanalların etkinliği fizyolojik veya farmakolojik ajanlar ile değişmektedir. Ketokanazol (BK_{Ca}), kromakalim (K_{ATP}) staurosporin (K_V) gibi K^+ kanal açıcıları veya 4-AP (K_V), iberiotoxin (BK_{Ca}), glibenklamid (K_{ATP}) gibi blokörler kanal işlevlerini etkilemektedir.

Voltaja Duyarlı Potasyum Kanalları

Voltage kapılı potasyum kanalları, insanda 40 gen tarafından kodlanan, tüm vücut dokularında dağılan 12 alt aileye (K_V1 - K_V12) sahip geniş bir bir aile oluşturur (Grizel vd., 2014). Gastrointestinal kanalda, K_V kanallarının konumları ve izoformları değişkendir. Bu kanallar, 1) K_V1 - K_V6 alt ailelerinin ve K_V8 - K_V9 alt ailelerinin üyeleri; 2) K_V7 alt ailesinin proteinleri (K_{CNQ} ailesi); 3) K_V10 - K_V12 alt aileleri olmak üzere üç ana grupta incelenir (Kew & Davies, 2010).

Voltage bağımlı K_V kanalları α ve β alt birimlerinden oluşur. K_V 'nin α alt birimleri kanala iletkenlik kazandıran gözenek oluştururken, β alt birimleri ise kanal fonksiyonunu modüle eden yardımcı alt birimlerdir. K_V kanalları, dinlenme membran potansiyelinin düzenlenmesi, aksiyon potansiyelinin başlatılması ve repolarizasyon fazına aracılık ederek hücrelerin uyarılabilirliğini düzenlemede önemli rol oynamaktadır. K_V kanalları, -70 ile +40 mV arasında geniş bir membran potansiyeli aralığında aktive olabilir. Bu kanalların açılma olasılığı voltage ile artar ve depolarizasyon ile inaktive duruma geçer. K_V kanallarından geçen akımlar, aktivasyon ve inaktivasyon oranı temelinde, $I_{KV-hızlı}$ (A-tipi akımlar) ve $I_{KV-yavaş}$ (gecikmeli doğrultucu kanallar) olarak sınıflandırılır (Kito & Suzuki, 2007; Schmalz vd., 1998). A tipi akımların inhibisyonu, düz kas uyarılabilirliğini ve kontraktilesini artırır (Currò, 2016). Özefagus, gastrik fundus ve antrum, jejunum, ileum ve kolon dahil olmak üzere çeşitli gastrointestinal sistem dokularında, A tipi akımların varlığı tipik özellikleriyle kaydedilmiştir (Amberg vd., 2003). Gastrointestinal düz kas hücrelerinde A tipi akımların, hücre uyarılabilirliği ve enzim bağımlı olarak K_V kanallarının aktivasyon sürecine katkısı olduğu bilinmektedir (Currò, 2016).

Yürüme engelli multipl sklerozlu erişkin hastalarda kullanılmak üzere Kv kanal blokörü 4-AP, Avrupa'da fampridin ve ABD'de dalfampridin adıyla onaylanmıştır. Uzatılmış salımlı tabletlerde günde iki kez 10 mg dozunda kullanılır. Uzun süreli uygulamalarda, kararlı durumdaki plazma konsantrasyonlarının düşük mikromolar seviyede kalması sebebiyle bu dozlar önemli gastrointestinal motilite etkileri oluşturmak için çok düşük konsantrasyonlardır. Sonuç olarak, bu kanalların gastrointestinal motilitenin düzenlenmesindeki rollerini ve gastrointestinal motor bozuklukların tedavisi için uygun bir terapötik strateji olarak modülasyonlarını kesin olarak belirlemek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kalsiyuma Duyarlı Potasyum Kanalları

Kalsiyum (Ca^{+2}) ile aktive olan K^+ (K_{Ca}) kanalları iyon iletim hızına göre beş ana kategoriye ayrılırlar. ($\text{K}_{\text{Ca}1-5}$). $\text{K}_{\text{Ca}1-3}$ kanalları ayrıca sırasıyla yüksek iletkenli (BK_{Ca}) kanallar, orta iletkenli (IK_{Ca}) kanallar, küçük iletkenli (SK_{Ca}) kanallar olarak da adlandırılır.

Kalsiyum duyarlı $\text{K}_{\text{Ca}1-3}$ kanalları, hücre içi Ca^{2+} seviyelerindeki artışla aktive olur. Ancak $\text{K}_{\text{Ca}2}$ ve $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ kanallarından farklı olarak $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ kanalları, voltaj bağımlı olarak membran depolarizasyonu ile de etkisiz hale getirilir (Rothberg, 2012). Bu özellikler, nörotransmitter salınımının düzenlenmesi ve düz kas kontraktilesi gibi uyarılabilir hücrelerde önemli fonksiyonel roller verir. $\text{K}_{\text{Ca}4.1}$, 4.2 ve 5 kanalları yapısal homolog oldukları için bu familyaya aittir. Ancak Ca^{+2} tarafından aktive edilmez; $\text{K}_{\text{Ca}4}$ kanalları, hücre içi Na^+ ve Cl^- seviyelerindeki artışla aktive olurken, $\text{K}_{\text{Ca}5}$, hücre içi alkalinizasyon ile aktive edilir (Wei vd., 2005). $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$, 2 ve 3.1'in gastrointestinal sistem organlarının kas tabakalarında, düz kas hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir.

İberiotoksin gibi $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ kanal blokörlerinin, ileum longitudinal kasının (Hong vd., 1997) ve gastrik fundus kasının (Ipavec & Currò, 2015) kasılma aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Özetle, K_{Ca} kanalları gastrointestinal düz kas kontraktilesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

İçeri Doğrultucu Potasyum Kanalları

İlk olarak iskelet kasında keşfedilen içeri doğrultucu potasyum kanalları (K_{IR}), kardiyak miyositler, glial hücreler, nöronlar, endotelial ve düz kas hücreleri dahil olmak üzere çok sayıda hücrede bulunmuştur. K_{IR} kanallarının ortak moleküler yapısı, α -alt birimlerinin tetramerik bir birleşimi olarak tanımlanır. Alt birimler, iki transmembran (TM1 ve TM2) bölgesi, bir gözenek oluşturan (H5) halka ve sitozolik amino grubu (NH_2) ve karboksil grubu ($COOH$) terminallerini içerir. Her K_{IR} alt birimi, fizyolojik koşullarda kanalların potasyum denge potansiyeline negatif membran potansiyellerinde hücre içine büyük bir K^+ iletkenliği üretirken, pozitif potansiyellerde akımın azalmasına izin verdiklerinden bu şekilde adlandırılırlar.

K_{IR} kanallarının fizyolojik aktivitesi iyonların akışı, hücrelerde gözenek açılması ve kanalların yerleşme düzenine bağlıdır. İyonlar, poliaminler, nükleotidler, lipidler ve çeşitli hücre içi proteinler ise gözenek açılmasını ve iyon akışını düzenleyen başlıca faktörlerdendir. İçeri doğru doğrultucu kanalların (K_{IR}), insanlarda 15 farklı alfa alt birimini kodlayan 15 K_{IR} geni vardır. Dört fonksiyonel grupta sınıflandırılan yedi K_{IR} kanalı alt ailesi vardır: 1) Klasik K_{IR} kanalları ($K_{IR} 2.x$), 2) G-protein kapılı ($K_{IR} 3.x$), 3) K^+ taşıyıcı kanalları ($K_{IR} 1.x$, $K_{IR} 4.x$, $K_{IR} 5.x$ ve $K_{IR} 7.x$), 4) ATP'ye duyarlı K^+ kanalları. Önemli K_{IR} kanalları, ATP'ye bağımlı olanlar ($K_{IR} 6$) ve G proteinleri tarafından düzenlenenlerdir (K_{IR}) (Y. Kubo vd., 2005). $K_{IR} 6$ kanalları, ATP'nin hücre içi konsantrasyonundaki azalmaya yanıt olarak açılır. K_{IR} kanalları için en yaygın kullanılan blokörler Ba^{2+} ve Cs^+ iken, TEA ve 4-AP'nin ise çok az etkileri vardır.

ATP Duyarlı Potasyum Kanalları

ATP duyarlı potasyum (K_{ATP}) kanalları, sinir sistemi, GİS'deki düz kaslar ve pankreas β hücreleri dahil olmak üzere çeşitli dokularda bulunur ve bu sistemlerde önemli fizyolojik roller oynar. Klasik K_{ATP} kanalları içe doğru doğrultucu K^+ kanal alt birimi ($K_{IR} 6.x$) ve sülfonilüre reseptörleri (SUR1, SUR2A ve SUR2B) olmak üzere 2 tip alt birimden oluşur. K_{ATP} kanalının, Gİ yolun düz kas hücrelerinde ekspresyonu tanımlanmıştır. Düz kasta K_{ATP} kanallarını oluşturan alt üniteler muhtemelen $K_{IR} 6.2$ ve SUR2B'dir (Hambidge vd., 1998).

ATP duyarlı K_{ATP} kanalının düzenlenmesi sAMP-PKA/PKC sinyal yolağına bağlıdır. Bazı inhibitör nörotransmitterler, G-protein kenetli reseptörlerin $G\alpha$ alt ünitesine bağlanarak adenilat siklazı aktive eder, sAMP'yi artırır ve PKA'ya bağlı fosforilasyona neden olur, bu düz kas hücrelerinde K_{ATP} 'nin aktive edilmesi ile sonuçlanır, böylece Gİ motiliteyi azaltır. Kalsitonin geni ile ilişkili peptit, adenosin ve prostasiklin gibi siklik AMP'yi yükselten ajanlar ve spesifik K_{ATP} kanal açıcıları (Diazoksit vb.) Gİ motiliteyi azaltmak için kullanılabilir. Ayrıca K_{ATP} kanallarını aktive etmenin, gastrik epitelde mukozal kan akışını arttırdığına ve mukozal onarımı desteklediğine dair çok sayıda çalışma vardır. Buna karşılık, gastrointestinal sistem organları düz kası K_{ATP} kanallarını bloke eden asetilkolin gibi uyarıcı nörotransmitterler, PKC aktivasyonu yoluyla membran depolarizasyonuna neden olur. Glibenklamid, tolbutamid gibi K_{ATP} kanal blokörleri, asetilkolinin GİS düz kası üzerindeki bu etkilerini taklit etmektedir (Radulovic vd., 2015).

2.7. H_2S ve Potasyum Kanalları İlişkisi

Memeli hücrelerinde endojen olarak üretilen H_2S , birçok fizyolojik olay ve hastalığın patofizyolojisinde önemli rolü olan bir nöromodulatördür. İnsanda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalar, düz kaslarda inhibitör etkili bir nörotransmitter olduğunu ve yeni bir terapötik hedef olabileceğini ileri sürmüştür (Agis-Torres vd., 2018; D'Emmanuele di Villa Bianca vd., 2016; Martinez-Cutillas vd., 2015; Nalli vd., 2017).

Çeşitli dokularda H_2S ile indüklenen gevşeme yanıtına, potasyum kanallarının katkıda bulunduğu dair kanıtlar artmaktadır. Sıçan koroner arterlerinde yapılmış bir çalışmada, H_2S ' in gevşetici etkisinin K_v kanalları aracılı, sıçan mezenterik arterlerinde BKCa kanalları aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (Cheang vd., 2010; Jackson-Weaver vd., 2011).

Yapılan çalışmalar GİS dokularında K^+ kanal blokajının, H_2S 'in indüklediği gevşemeyi azalttığı veya ortadan kaldırdığını ortaya koymuştur. Sıçan gastrik pilorik sfinkter dokusu ile yapılan bir çalışmada, K_{ATP} kanal blokörü tarafından NaHS ile indüklenen gevşemenin tersine çevrildiği gösterilmiştir (Medeiros vd., 2012). NaHS'nin insan safen damarı üzerinde NO aracılı gevşetici etkisi olduğu ve bu etkiye

BK_{Ca} ve K_{ATP} kanallarının katkısı olduğu bulunmuştur (Marinko vd., 2021). Sıçan kolon düz kasında yapılan çalışmada, BK_{Ca} kanal blokörünün H₂S'in gevşetici etkisini azalttığı görülmüştür. Yine mide fundus dokusunda ve düz kasında yapılan çalışmalarda, sırasıyla K_V ve non-selektif K⁺ kanalları blokörlerinin, H₂S'in etkilerini tersine çevirdiği gösterilmiştir (X. Meng vd., 2015; P. Zhao vd., 2009).

Fizyolojik olarak potasyum kanalları ve taşıyıcıları, mide asidinin üretilmesi ve salgılanmasında görevlidir ve bağırsakta potasyumun salınımında rol oynar. Potasyum kanallarının düz kas kontraktilesinin düzenlenmesine önemli katkısı ve plazma membranına yerleşimi göz önüne alındığında, irritabl barsak sendromları gibi gastrointestinal motilite bozukluklarının tedavisi için potansiyel terapötik hedefler olabilirler.

İrritabl barsak sendromu modeli oluşturulmuş sıçanlarda, H₂S'in gastrointestinal spazm ağrılarını azalttığı gösterilmiştir. H₂S'in bu antinospazmik etkisini K_{ATP} kanalları ve NO aracılığıyla gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (Distrutti vd., 2006). Sıçanlarda yapılmış bir çalışmada, H₂S donörü NaHS'nin K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid ile sistemik uygulanmasıyla, H₂S'in gastroprotektif etkisi ile potasyum kanallarının ilişkisi incelenmiştir. NaHS, K_{ATP} aktivasyonuna bağlı olarak damarlarda genişlemeye neden olmuştur ve buna bağlı olarak gastrik mukozal kan akımında artış olduğu düşünülmüştür (Fiorucci vd., 2005).

Bu bulgulara dayanarak, H₂S'in gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerine K⁺ kanallarının rolü ve katkılarının araştırılması ve güvenli ve spesifik hedefler belirlenmesi amacıyla yeni araştırmalarda ilgi odağı haline gelmiş bir konudur.

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı

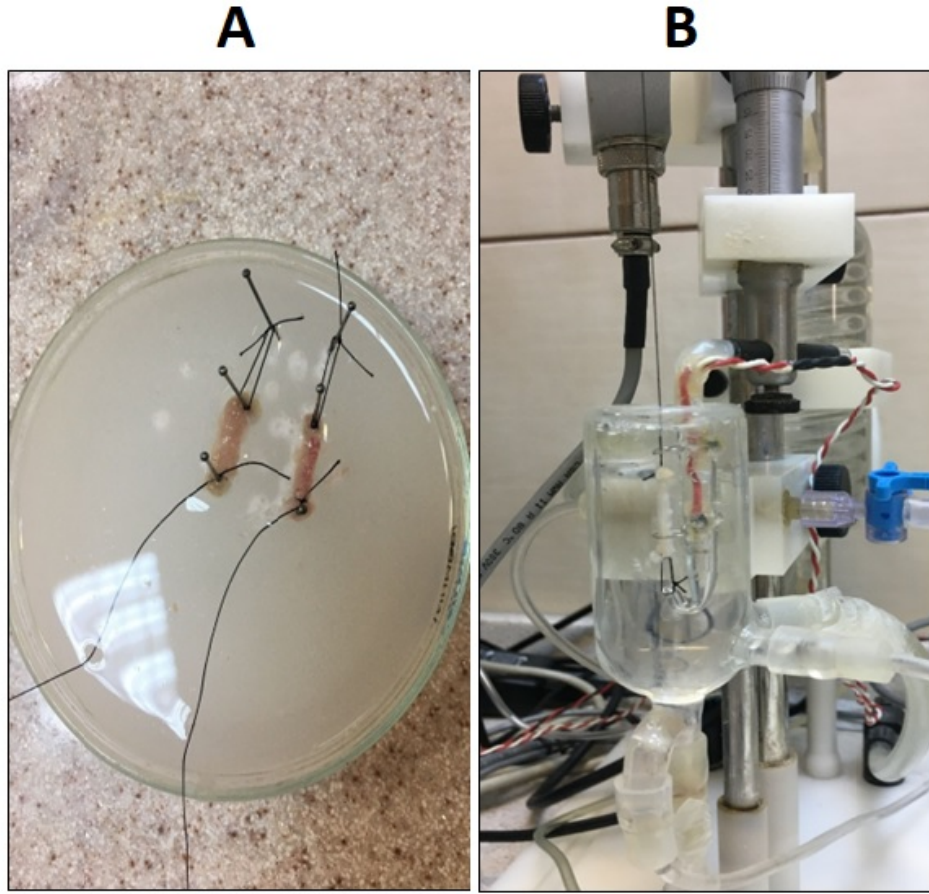
Bu tez çalışmasında, Deney hayvanları üretim merkezinden temin edilen erişkin 2.5-3.5 kg. ağırlığında 36 adet erkek albino tavşan kullanıldı. Çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (G.Ü.E.T.-20.017). Tüm deneysel süreçler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütüldü. Tavşanlar standart laboratuvar koşullarında [$20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık] tutulmuş ve su içmeleri serbest, standart laboratuvar hayvan yemi ile beslenmiştir.

3.2. İzole Tavşan Alt Özefagus Sfinkter Preparatının Hazırlanması

Tavşanlar ketamin/ksilazin (50mg/kg /5 mg/kg, i.v.) ile anestezi edildikten sonra karın orta hat bölgesinden açılarak mide ile özefagus bileşkesindeki alt özefagus sfinkteri kesilerek vücut dışına çıkarılmıştır. Dokular, önceden 37°C 'ye ısıtılmış ve %5 CO_2 , %95 O_2 karışımı ile havalandırılan Krebs solüsyonu bulunan petrilere konulmuş, alt özefagus sfinkteri çevresindeki bağ dokulardan temizlendikten sonra herhangi bir hasar görmeden izole edilmiştir. Dokular 0.3-0.5 cm eninde, 1.5-2 cm boyunda şeritler halinde kesilerek hazırlanıp her bir sfinkterden 2 adet şerit elde edilmiştir.

3.3. İzole Organ Banyosu Sistemi

Dokular bir ucu organ askısına, bir ucu izometrik kasılmaları kaydetmek için izometrik kuvvet transdüserine (MAY, FDT 10-A, COMMAT Ltd., Ankara, Türkiye) bağlı olacak şekilde Krebs solüsyonu içeren 20 ml'lik organ banyosuna yerleştirilmiştir. İzometrik düz kas kasılma ve gevşemeleri transdüserler aracılığı ile (BIOPAC, MP35 System Inc, COMMAT Ltd., Ankara, Türkiye) kaydedilmiştir.



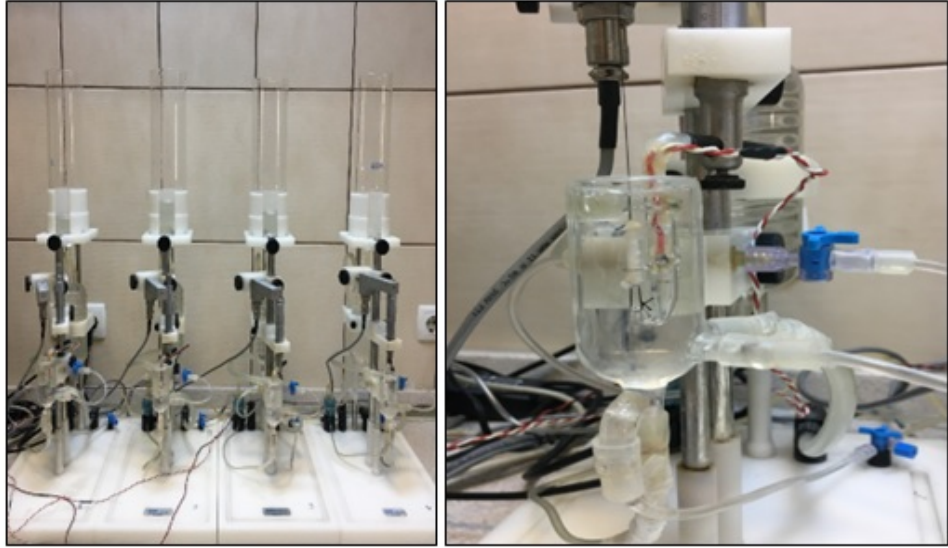
Şekil 3.1 AÖS şeritlerinin banyolara asılma işlemi.

(A resmi; AÖS şeritlerinin bağ ve yağ dokudan temizlenmiş asılmaya hazır hale getirilmiş şekli. B resmi; AÖS şeritlerinin gerilimini ölçmek için askıya asılmış banyo içerisindeki şeklidir.)

İzole doku banyo sistemi, bilgisayar ile bütünleşmiş şekilde çalışarak, in vitro AÖS şeritlerinde oluşturulan kasılma ve gevşeme cevaplarının veriye dönüştürülmesi ile analiz edilmesini sağlamaktadır. Her bir banyoda bulunan özel transdüserler ile mekanik sinyallerin dönüştürülmesi, daha sonra bir poligraf cihazı aracılığıyla dijital sinyallere dönüştürülerek bilgisayar programında grafikler haline gelmesi sağlanmaktadır. Tüm bu süreçlerin sonunda veriler kaydedilerek analiz edilmiştir ve sonrasında elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. İzole Doku Banyosu Kayıt ve Analiz Sistemi-I



Şekil 3.3. İzole Doku Banyosu Kayıt ve Analiz Sistemi-II

İzole Doku Banyosu Kayıt ve Analiz Sistemini oluşturan tüm bölümler:

- I. MAY, FDT 10-A Force Displacement Transducer,
- II. 20 ml'lik 4 adet Doku Banyosu
- III. WBC3044-PR Banyo Su Sirkülatörü
- IV. Biopac Student Lab Bilgisayar Yazılımı
- V. Poligraf, MP 35 Data Acquisition Sistem
- VI. %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren gaz tüpü

3.4. Deney Protokolü

Dokulara deneylerin başlangıcında 1 g ön gerilim uygulanmış ve 15 dk da bir yıkanarak dokular bir saat dengelenmeye bırakılmıştır. Spontan tonusun oluşması nedeniyle bozulan gerim dinlenme süreci boyunca tekrar 1 g'a ayarlanmıştır.

Dinlenme ve dengelenme periyodundan sonra 80 mM potasyum klorür (KCl) ile şeritlerin canlılığı değerlendirilmiş ve kasılma güçleri test edilmiştir. Dengeli bir şekilde (stabil olarak) en az 2 gr kasılan dokular deneysel protokollere uygun görülerek çalışmaya devam edilmiştir. Eğer kasılma 2 gr altında ise o doku deney sürecinden çıkarılmıştır. KCl ile oluşturulan kasılmanın ardından her yeni protokole başlamak için dokular, 15 dk'da bir yıkanarak 60 dk süre ile 1 g gerim altında dinlendirilmiştir.

Dinlenme periyodunun ardından yapılan ön deneylerde Elektriksel Alan Uyarısı (EAU) için uygun parametreler belirlenmiştir. EAU için dokular iki platin elektrod arasına vertikal olarak ve elektrodlara değmeyecek şekilde asılmıştır. Elektriksel stimülasyon için STPT 03 Stimülatör (STPT 03, May Research Stimulator; COMMAT Communication Co., Ankara, Türkiye) kullanılmıştır.

Altı tavşandan alınan altı farklı AÖS şeridinde, deneyler için en uygun koşullandırmayı seçmek amacıyla her şeridin etrafına yerleştirilen iki platin halka elektrot ile çeşitli frekanslarda (1, 2, 4, 18, 16 ve 32 Hz) ve çalışma sürelerinde (1, 5, 10 ve 20 saniye) EAU uygulanmıştır. Tavşan AÖS kasında kasılmaya aracılık etmek için en uygun EAU parametreleri 10 saniye boyunca 16 Hz olarak belirlenmiştir. Önceki çalışmalara dayanarak, bu çalışmada tavşan AÖS şeritlerinin EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları 120 s. aralıkla 10 s. süre ile 60 V, 1 ms. parametrelerinde ve 16 Hz. frekansta alınmıştır (Jia & Zhao, 2021; Kara, Halil vd., 2016; Matsuda vd., 2008).

Elektriksel alan uyarısı, bifazik bir AÖS gevşemesine neden olur (Uc vd., 1999). Önceki çalışmamızda H₂S'in tavşan AÖS dokularından alınan bifazik yanıtlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bifazik yanıtların AÖS ile başlayan bir "on" fazı ve AÖS'nin bitimiyle başlayan bir "off" fazı olduğu bulunmuştur. NaHS ve L-Sistein, EAU aracılı yanıtların "off" fazını ve EAU aracılı NANK yanıtları azaltmıştır (Kara,

Halil vd., 2016). Bu sonuçlara dayanarak, çalışmamızda, "off" fazı tüm dokularda stabil olduğu için ilaçların etkileri "off" fazında değerlendirilmiştir.

EAU aracılı kasılma yanıtları, sempatik sinir sisteminin ve prostaglandinlerin etkisini ortadan kaldırmak için, sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin (10^{-6} M) ve siklooksijenaz inhibitörü indometasin (10^{-5} M) varlığında alınmıştır. Guanetidin ve indometasin organ banyosuna EAU aracılı kasılma yanıtları elde edilmeden 30 dk. önce eklenmiştir.

Ayrı bir seri deneyde EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtlarının incelendiği deney gruplarında ise EAU ile kasılmadan 30 dk. önce organ banyosuna guanetidin ve indometasin ile endojen nitrejik sistemin etkisini ortadan kaldırmak için NOS inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) de eklenmiştir.

Her dokudaki kontrol kasılma cevapları üzerinde sadece bir ilacın etkisi incelenmiştir. Her protokolün sonunda EAU sistemi devre dışı bırakıldı ve dokular stabilize etmek amacıyla 15 dakikalık aralıklarla 60 dakika boyunca yıkandı.

Ön çalışmalarda zaman kontrollü deneyler gerçekleştirilmiş ve kasılma cevaplarında herhangi bir azalma görülmemiştir (n=2).

3.4.1. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarının Tanımlanması:

Alt özefagus sfinkteri şeritlerinde EAU kasılma yanıtları stabilize edildikten sonra, farklı dokulara farklı agonist ve antagonistler (sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin, 10^{-6} M; siklooksijenaz inhibitörü indometasin, 10^{-5} M; muskarinik reseptör antagonisti atropin, 10^{-6} M; antikolinesteraz neostigmin, 10^{-6} M; nitrik oksit sentez inhibitörü L-NAME, 10^{-4} M) uygulanarak EAU ile oluşan yanıtlar tanımlandı. EAU ile indüklenen cevaplar, uygulamayı takiben 30 dakika boyunca kaydedilmiştir. Ardından, ilaçların yıkanması gerçekleştirilmiştir.

Her bir dokuda sadece bir maddenin kontrol yanıtları üzerine olan etkisine bakılmıştır. Bir grup dokuda ise çözücü olarak kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO)'nun EAU ile elde edilen kasılma yanıtları üzerine etkisi incelenmiştir.

3.4.2. H₂S'in EAU-Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına Etkisinin Değerlendirilmesi:

Kasılma yanıtları stabilize edildikten sonra, artan dozlarda NaHS (H₂S donörü) (10^{-6} – 3×10^{-3} M), L-Sistein (endojen H₂S prekürsörü) (10^{-5} – 3×10^{-3} M), DL-proparjilglisin (PAG-CSE enzim inhibitörü) (10^{-5} – 3×10^{-3} M) ve Aminooksiasetik asit (AOAA-CBS enzim inhibitörü) ortama eklendi. Her bir dokuda sadece bir ilacın kontrol yanıtları üzerindeki etkisi araştırıldı. EAU ile indüklenen cevaplar, uygulamayı takiben kaydedildi. Ardından, ilaçların yıkama işlemi gerçekleştirildi. NaHS, L-Sistein, PAG ve AOAA'nın etkileri NO-bağımlı ve NO-bağımsız gruplarda ayrı olarak değerlendirildi.

3.4.3. Postsinaptik Yanıtların Tanımlanması:

Alt özefagus sfinkteri şeritleri, 80 mM potasyum klorür (KCl) ve 2,5 mM kalsiyum (Ca²⁺) ile guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında kasıldı. 30 dakika sonra H₂S donörü NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M), endojen H₂S prekürsörü L-Sistein (10^{-5} – 3×10^{-3} M), endojen H₂S sentez inhibitörleri PAG (10^{-5} – 3×10^{-3} M) ve AOAA (10^{-5} – 3×10^{-3} M) eklenerek kasılma üzerine etkileri araştırıldı.

3.4.4. L-Sistein ve H₂S Donörünün Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin

Katkısı:

Alt özefagus sfinkteri şeritlerinde guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında kontrol kasılma yanıtları 16 Hz. de elde edildi. Kasılma yanıtları stabilleştikten sonra, artan dozlarda L-Sistein (10^{-5} – 3×10^{-3} M) ve NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M)'nin etkisi potasyum kanal blokörleri; ATP bağımlı kanal (K_{ATP}) blokörü glibenklamid (10^{-6} M), kalsiyumla aktive edilen potasyum kanal (K_{Ca}) blokörü iberiotosin (10^{-8} M), voltaj bağımlı potasyum kanal (K_v) blokörü 4-AP (10^{-4} M) ve non-selektif K kanal blokörü TEA (10^{-4} M) varlığında gözlemlendi. EAU ile indüklenen cevaplar, uygulamayı takiben kaydedilmiştir. 60 dakikalık yıkama ve stabilizasyon süresinden sonra, EAU tekrar verildi ve aynı deneysel prosedür antagonistlerin varlığında gerçekleştirildi. EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerine L-Sistein ve H₂S donörünün etkisine potasyum kanallarının katkısı araştırıldı. Her bir potasyum kanal blokörünün etkisi ayrı dokularda değerlendirildi.

Farklı bir seri deney grubunda, NOS inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) varlığında, L-Sistein ve H₂S donörünün EAU aracılı NO-bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki etkisine potasyum kanallarının katkısı araştırıldı. Her bir potasyum kanal blokörünün etkisi ayrı dokuda değerlendirildi.

3.4.5. H₂S Sentez İnhibitörlerinin Etkisine Potasyum Kanal Blokörlerinin

Katkısı:

Alt özefagus sfinkteri şeritlerinde, guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında kontrol kasılma yanıtları 16 Hz. de elde edildi. Kasılma yanıtları stabilleştikten sonra, artan dozlarda PAG (10^{-5} – 3×10^{-3} M) ve AOAA (10^{-5} – 3×10^{-3} M)'nın etkisi gözlemlendi, aynı protokol potasyum kanal blokörleri; ATP bağımlı kanal (K_{ATP}) blokörü glibenklamid (10^{-6} M), kalsiyumla aktive edilen potasyum kanal (K_{Ca}) blokörü iberiotosin (10^{-8} M), voltaj bağımlı potasyum kanal (K_v) blokörü 4-AP (10^{-4} M) ve non-selektif K kanal blokörü TEA (10^{-4} M) varlığında tekrar edildi. EAU ile indüklenen cevaplar, uygulamayı takiben kaydedilmiştir. 60 dakikalık yıkama ve stabilizasyon süresinden sonra, EAU tekrar verildi ve aynı deneysel prosedür antagonistlerin varlığında gerçekleştirildi. H₂S sentez inhibitörlerinin EAU aracılı NO

bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki etkisine potasyum kanallarının katkısı araştırıldı. Her bir potasyum kanal blokörünün etkisi ayrı dokuda değerlendirildi.

Farklı bir seri deney grubunda, NOS inhibitörü L-NAME (10^{-4} M) varlığında, H_2S sentez inhibitörlerinin EAU aracılı NO-bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki etkisine potasyum kanallarının katkısı araştırıldı. Her bir potasyum kanal blokörünün etkisi farklı dokularda değerlendirildi.

3.5. Deneylerde Kullanılan Solüsyon ve Maddeler

Deneylerde fizyolojik solüsyon olarak kullanılan Krebs-Henseleit çözeltisi bileşimi (mM), NaCl 118; KCl 4.7; $NaHCO_3$ 25; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.9; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.26; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5 ve Glukoz monohidrat 11 olarak distile suda çözünmesiyle hazırlandı.

Deneylerde kasılma yanıtlarını almak üzere kullanılan 80 mM KCl'lik Krebs-Henseleit çözeltisi ise NaCl (42.7 mM), KCl (80.0 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (0.9 mM), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.26 mM), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.5 mM) ve Glukoz monohidratın (11 mM) distile suda çözünmesiyle hazırlandı.

NaHS, L-NAME hidroklorid, L-Sistein hidroklorid monohidrat, PAG, AOAA, TEA, İberiotoksin, 4-AP, Glibenklamid, Neostigmin, İndometasin, Merck/Sigma-Aldrich Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD)'den temin edilmiştir. Atropin sülfat, neostigmin, guanetidin monosülfat, L-NAME hidroklorid, NaHS, L-Sistein, PAG, AOAA, TEA, İberiotoksin, 4-AP distile suda, İndometasin ve Glibenklamid DMSO'da çözünmüştür.

3.6. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

NaHS, L-Sistein, PAG ve AOAA'nın kontrol yanıtları üzerindeki etkisi ifade edilirken, EAU aracılı kasılma yanıtları kontrol yanıtlarının yüzdesi olarak hesaplandı. Artan dozlarda H₂S uygulamasından sonra EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerindeki azalma H₂S ile indüklenen değer olarak kullanılmıştır. Kontrol olarak, ilk H₂S uygulamasından önceki son kasılma değeri kullanıldı. Deneysel sonuçlar, ortalama değer $\pm$ ortalamanın standart hatası (SEM) ile ifade edilmiştir.

Örneklem büyüklüğü hesaplanması bir ön çalışmaya dayanmaktadır. Online yazılım (Experimental Design Assistant; alpha=0.05, power=85%) kullanılarak uygun örneklem büyüklüğü 6 olarak bulunmuştur. Cohen's d kılavuzuna göre standart etki büyüklüğü 1 (orta etki) olarak seçilmiştir. Tek taraflı bir test gerçekleştirilmiştir. Standart sapma (SD) değeri 0,6 olarak bulunmuştur ve SPSS 25.0 kullanılarak hesaplanmıştır Shapiro-Wilk ile yapılan veri normallik testinde 0,05'ten büyük bir değer bulunmuştur, bu da verilerin normal dağıldığını göstermektedir. Ayrıca, homojenlik testinde 0,05'ten büyük bir değer elde edilmiştir; böylece araştırma örnekleminin homojen olduğu kanıtlanmıştır.

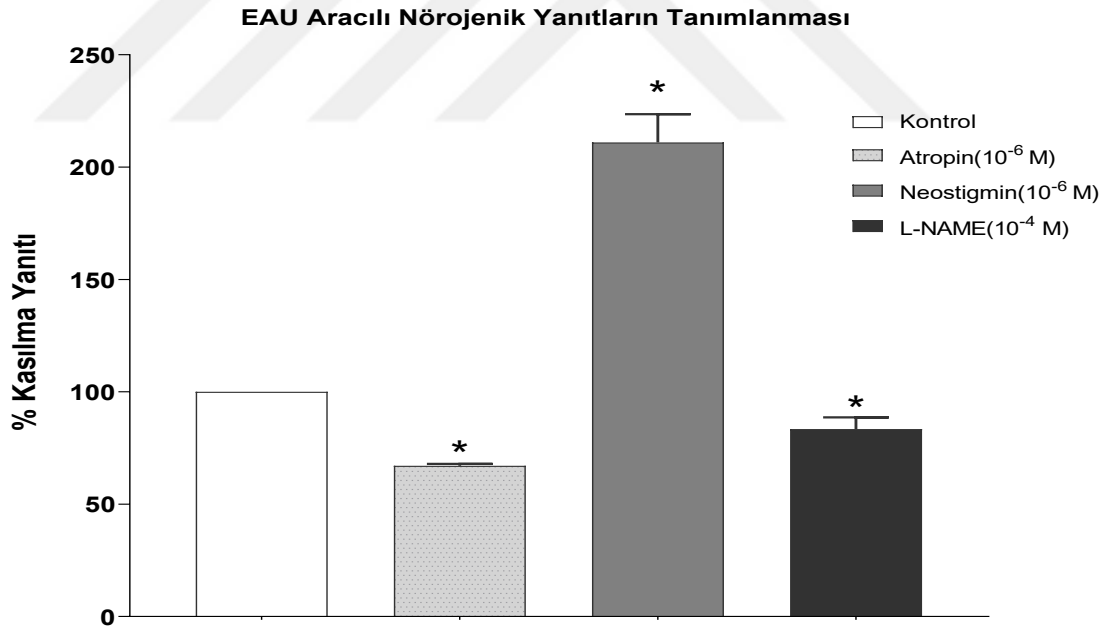
Verilerin istatistiksel analizi, SPSS 25.0 programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) ile yapıldı. Elde edilen sonuçların grafik çizimleri için GraphPad Prism 8.02 (GraphPad Software, San Diego, CA) kullanıldı. Deney gruplarından elde edilen yanıtların istatistiksel olarak anlamlılığını değerlendirmek için Mann Whitney U, Wilcoxon testi kullanıldı. Farklı grupları karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi ve ardından Bonferroni düzeltmesi ile post hoc analizi yapıldı. $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarının Tanımlaması:

EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M), EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamıştır. İndometasin' in çözücüsü olan DMSO, EAU aracılı yanıtları etkilememiştir.

Atropin (10^{-6} M), EAU aracılı kasılma yanıtlarının amplitüdlerini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%32.87 \pm 2.18$; $p < 0.05$; $n=4$). Neostigmin (10^{-6} M), EAU aracılı kasılma yanıtlarının amplitüdlerini istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırdı ($\%111.98 \pm 12.58$; $p < 0.05$; $n=4$). L-NAME (10^{-4} M), EAU aracılı kasılma yanıtlarının amplitüdlerini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı ($\%16.59 \pm 5.22$; $p < 0.05$; $n=4$).

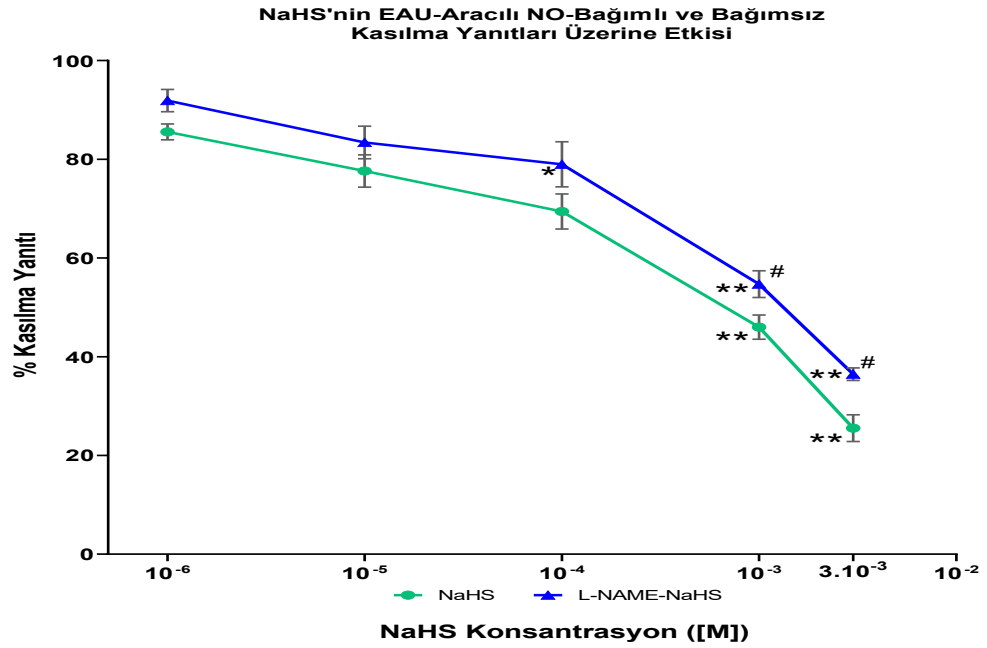


Şekil 4.1. EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine Atropin (10^{-6} M), Neostigmin (10^{-6} M) ve L-NAME (10^{-4} M) 'in etkisi. (Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi (*, $p < 0.05$, tüm gruplar $n=4$))

4.2. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine H₂S'in Etkisi:

NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M), EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerinde konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden oldu (3×10^{-3} M'da $74,46 \pm 2,73$; $p < 0,01$; $n=8$). NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M)'nin, EAU ile indüklenen kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisi zamanla geri döndü ve doku yeniden kasılmaya başladı. Böylece, kasılmalarındaki azalmanın spontan kasılma kuvveti kaybına bağlı olma olasılığı, önceki çalışmamızdaki zaman kontrollü deneylerle sınırlandırılmıştır.

NO-bağımsız gruplarda, H₂S donörü, NaHS 10^{-3} ve 3×10^{-3} M konsantrasyonlarında, L-NAME (10^{-4} M) ile inkübe edilmiş EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerini azaltmıştır (3×10^{-3} M'da $63,52 \pm 1,03$; $p < 0,01$; $n=8$). Yüksek konsantrasyonlarda NaHS ile indüklenen gevşemeler, NO-bağımsız grupta NO-bağımlı gruba kıyasla önemli ölçüde daha düşüktü ($p < 0,05$) (Şekil 4.2.1).



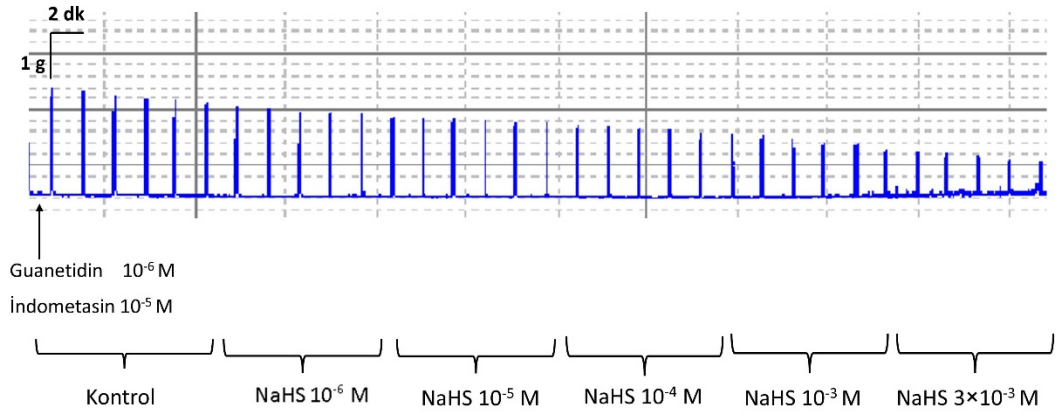
Şekil 4.2.1 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M)'nin etkisi.

(NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Kontrol grubuna göre anlamlılık *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, L-NAME (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, $p < 0,05$, tüm gruplar

n=6)

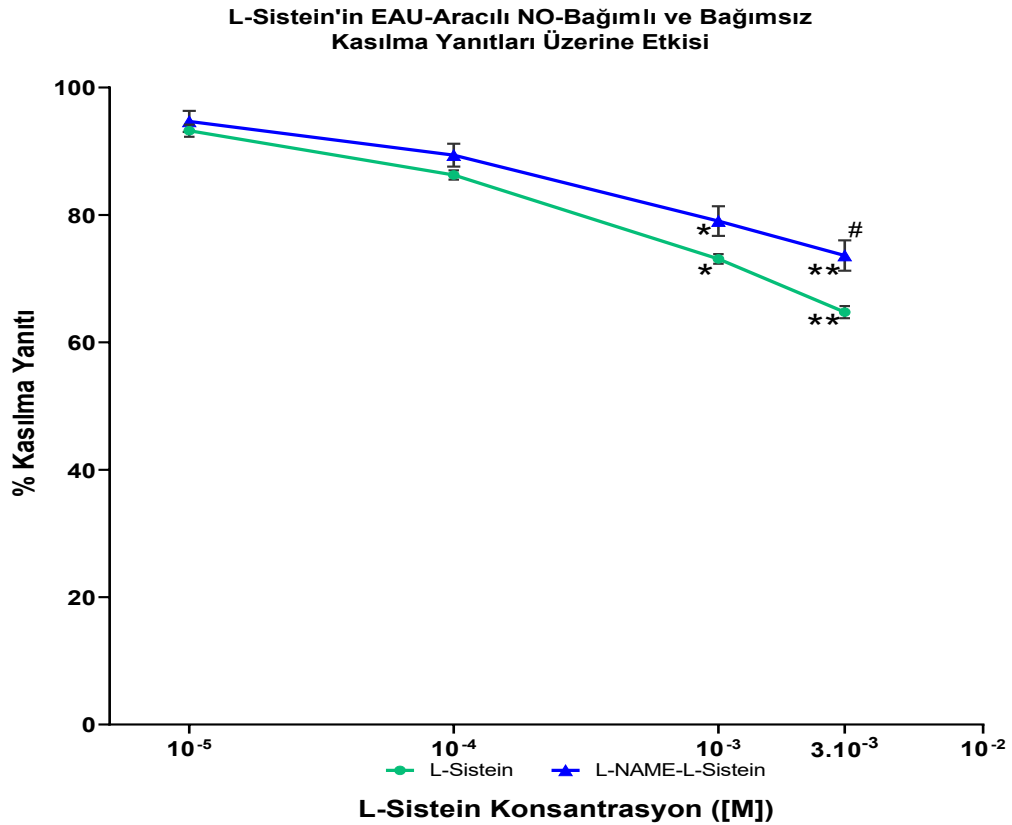
NaHS'nin (10^{-6} – 3×10^{-3} M) tavşan AÖS'sinde EAU ile indüklenen kasılma yanıtları üzerindeki etkisini gösteren tipik kayıt traseleri Şekil 4.2.2'de gösterilmiştir.

En yüksek NaHS konsantrasyonunun (3×10^{-3} M) tekrar tekrar uygulanmasından sonra bile banyo solüsyonunun yıkanmasını takiben kasılma aktivitesinin geri kazanımı hızlı ve tam olduğundan, bu dozların doku toksisitesine neden olduğuna dair bir kanıt yoktur.



Şekil 4.2.2 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine NaHS (10^{-6} – 3×10^{-3} M)'nin etkisi.

NO bağımlı grupta, L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M) EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerini konsantrasyona bağımlı bir şekilde, 3 mM'de $35,24 \pm 0,98$ maksimum değerle azaltmıştır ($p < 0,01$; $n=6$). NO-bağımsız grupta, 10^{-3} ve 3×10^{-3} M konsantrasyonlarındaki L-Sistein, EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerini anlamlı ve konsantrasyon bağımlı olarak azaltmıştır (3 mM'de $26,36 \pm 2,40$; $p < 0,01$; $n=6$). L-Sistein'in 3×10^{-3} M konsantrasyonundaki gevşetici etkileri, NO-bağımsız gruplarda, NO-bağımlı gruplara kıyasla önemli ölçüde daha düşüktü ($p < 0,05$) (Şekil 4.2.3).

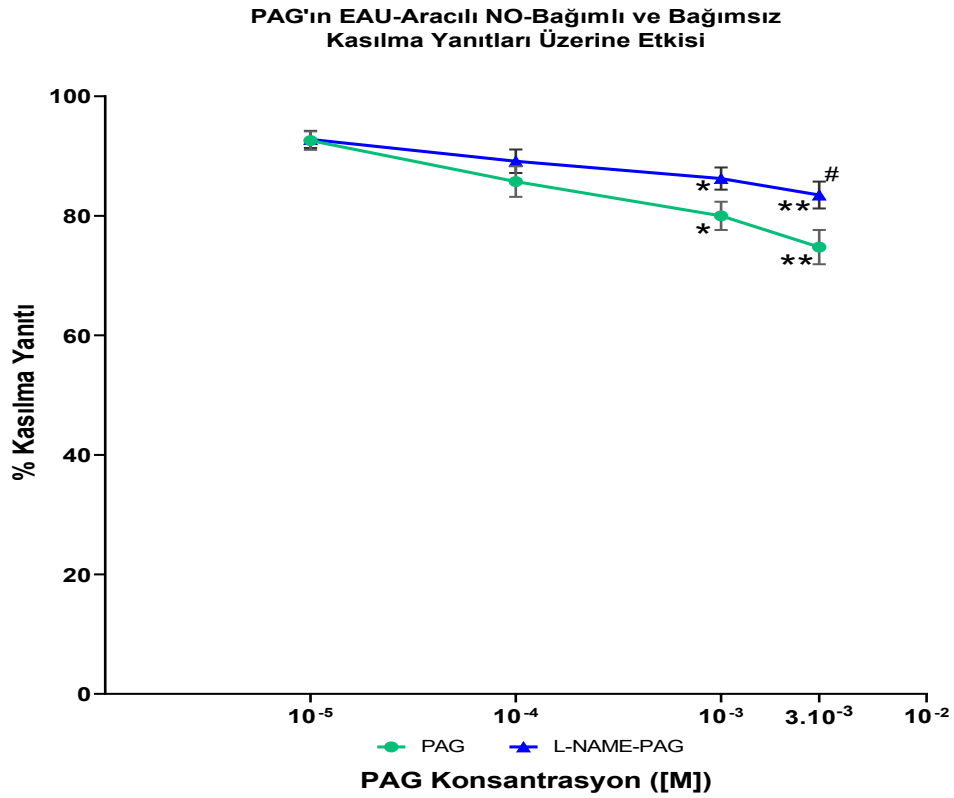


Şekil 4.2.3 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'in etkisi.

(NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Kontrol grubuna göre anlamlılık *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, L-NAME (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, $p < 0,05$, tüm gruplar $n=6$)

PAG (10^{-5} - 3×10^{-3} M), EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerini konsantrasyona bağımlı bir şekilde, 3 mM'de maksimum gevşeme ile AÖS'deki EAU aracılı kasılma yanıtlarını konsantrasyona bağımlı bir şekilde azalttı ($\%25.22 \pm 2.88$; $p < 0.01$; $n=6$).

Enzim inhibitörü PAG 10^{-3} M ve 3×10^{-3} M konsantrasyonlarında, NO'dan bağımsız grupta, EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerini konsantrasyona bağımlı olarak azalttı ($\%16.52 \pm 2.24$; $p < 0.01$; $n=6$). PAG'ın 3×10^{-3} M konsantrasyonundaki gevşetici etkileri, NO-bağımsız gruplarda, NO-bağımlı gruplara kıyasla önemli ölçüde daha düşüktü ($p < 0.05$) (Şekil 4.2.4).

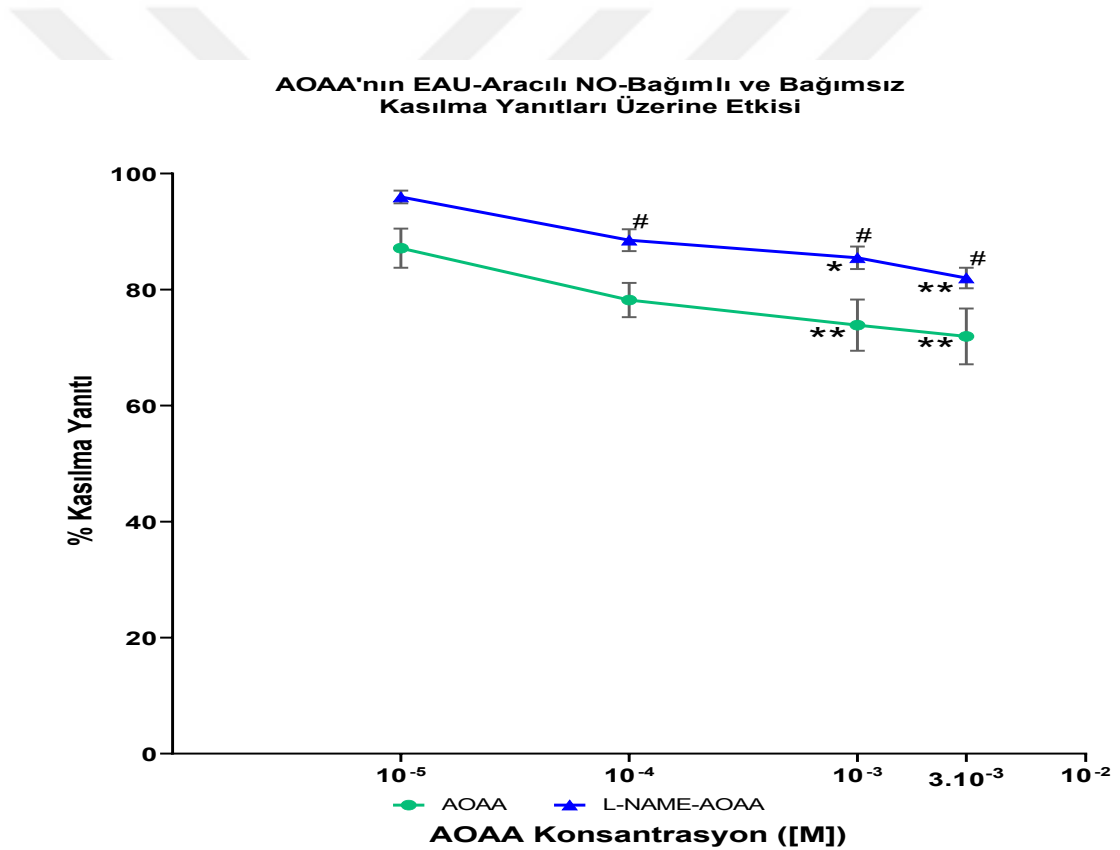


Şekil 4.2.4 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine PAG (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'ın etkisi.

(NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Kontrol grubuna göre anlamlılık *, $p < 0.01$, **, $p < 0.001$, L-NAME (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, $p < 0.05$, tüm gruplar $n=6$)

Diğer H₂S sentez inhibitörü AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M), EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerini konsantrasyona bağlı bir şekilde, 3 mM'de maksimum gevşeme ile EAU aracılı kasılma yanıtlarını konsantrasyona bağlı şekilde azalttı ($\%28.06 \pm \%4.83$, $p < 0.01$).

Enzim inhibitörü AOAA 10^{-3} ve 3×10^{-3} M konsantrasyonlarında, NO'dan bağımsız grupta, EAU ile indüklenen kasılma yanıtlarının amplitüdlerini konsantrasyona bağımlı olarak azalttı (3 mM'de $\%18,01 \pm 1,77$; $p < 0,01$; $n=6$). AOAA'nın 10^{-4} , 10^{-3} ve 3×10^{-3} M konsantrasyonlarındaki gevşetici etkileri, NO-bağımsız gruplarda, NO-bağımlı gruplara kıyasla önemli ölçüde daha düşüktü ($p < 0.05$) (Şekil 4.2.5).



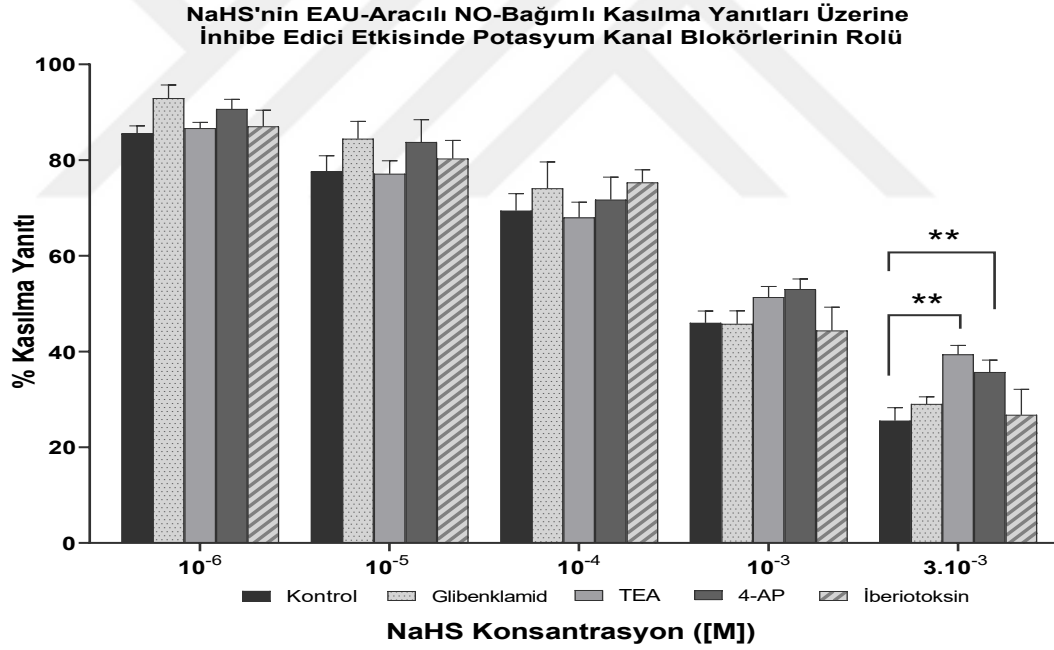
Şekil 4.2.5 EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M) 'nin etkisi.

(NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Kontrol grubuna göre anlamlılık *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, L-NAME (10^{-4} M) varlığında aynı dozdaki gruplara göre anlamlılık #, $p < 0.05$, tüm gruplar $n=6$).

4.3. EAU aracılı NO-Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine H₂S Donörünün Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:

Non-selektif K⁺ kanal blokörü TEA (10⁻⁴ M) ve K_V kanal blokörü 4-AP (10⁻⁴ M) ile dokuların 20 dk inkübasyonu, artan dozlarda NaHS'nin (10⁻⁶–3x10⁻³ M) EAU ile indüklenen kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini azalttı. Hidrojen sülfür donörü NaHS 3x10⁻³ M dozunda, farklı gruplarda TEA (10⁻⁴ M, %60.59 ± 1.86) ve 4-AP (10⁻⁴ M, %64.29 ± 2.49) varlığında istatistiksel olarak anlamlı ve konsantrasyona bağlı gevşetici etkiler görüldü (p<0.01; n=6) (Şekil 4.3.1).

Glibenklamid (10⁻⁶ M) ve İberiotoksin (10⁻⁸ M), artan NaHS dozlarının (10⁻⁶–3x10⁻³ M) EAU aracılı NO-bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisine istatistiksel olarak anlamlı bir katkıda bulunmadı.



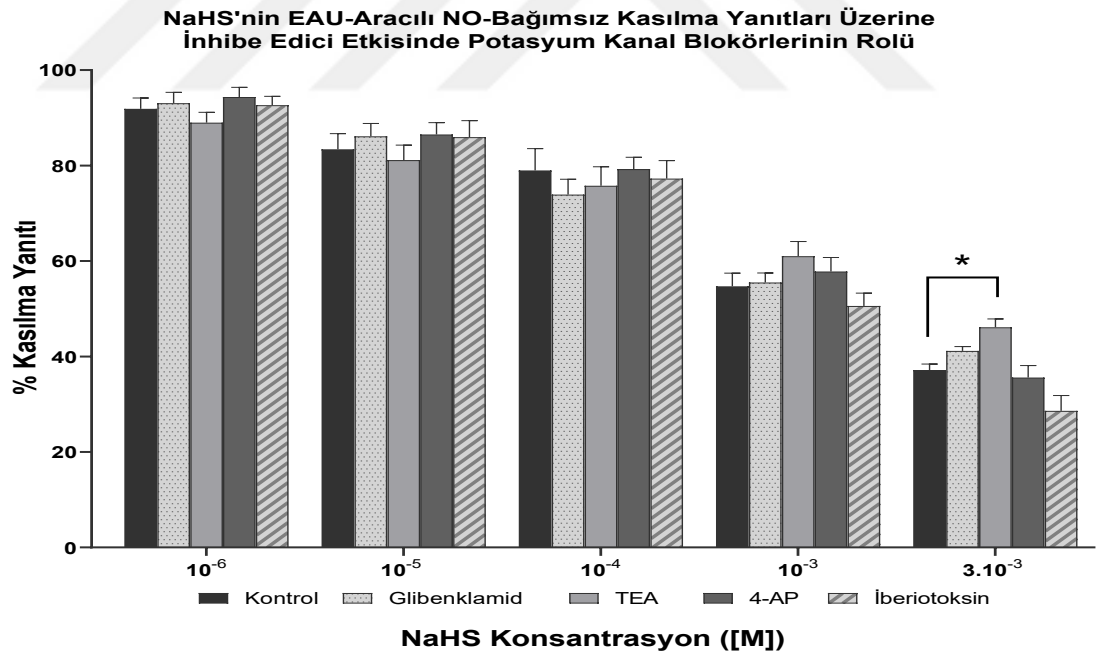
Şekil 4.3 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10⁻⁶ M), TEA (10⁻⁴ M), 4-AP (10⁻⁴ M) ve İberiotoksin (10⁻⁸ M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı nörojenik kasılma yanıtları üzerine NaHS (10⁻⁶ – 3x10⁻³ M) 'nin etkisi. (NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10⁻⁶ M) ve indometasin (10⁻⁵ M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Kontrole göre anlamlılık *, p<0.05, **, p<0.01, tüm gruplar n=6)

4.4. EAU aracılı NO-Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine H₂S Donörünün Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:

Non-selektif K⁺ kanal blokörü TEA (10⁻⁴ M) ile dokuların 20 dk inkübasyonu, artan dozlarda NaHS'nin (10⁻⁶–3x10⁻³ M) EAU aracılı NO-bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini azalttı.

Hidrojen sülfür donörü NaHS 3x10⁻³ M dozunda, TEA (10⁻⁴ M) varlığında istatistiksel olarak anlamlı ve konsantrasyona bağlı gevşeme gösterdi (%53.87 ± 1.74; p<0.05; n=6) (Şekil 4.4.1).

Glibenklamid (10⁻⁶ M), 4-AP (10⁻⁴ M) ve İberiotoksin (10⁻⁸ M), artan NaHS dozlarının (10⁻⁶–3x10⁻³ M) EAU aracılı NO-bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini azalttı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir katkıda bulunmadı.



Şekil 4.4 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10⁻⁶ M), TEA (10⁻⁴ M), 4-AP (10⁻⁴ M) ve İberiotoksin (10⁻⁸ M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız nörojenik kasılma yanıtları üzerine NaHS (10⁻⁶ – 3x10⁻³ M) 'nin etkisi.

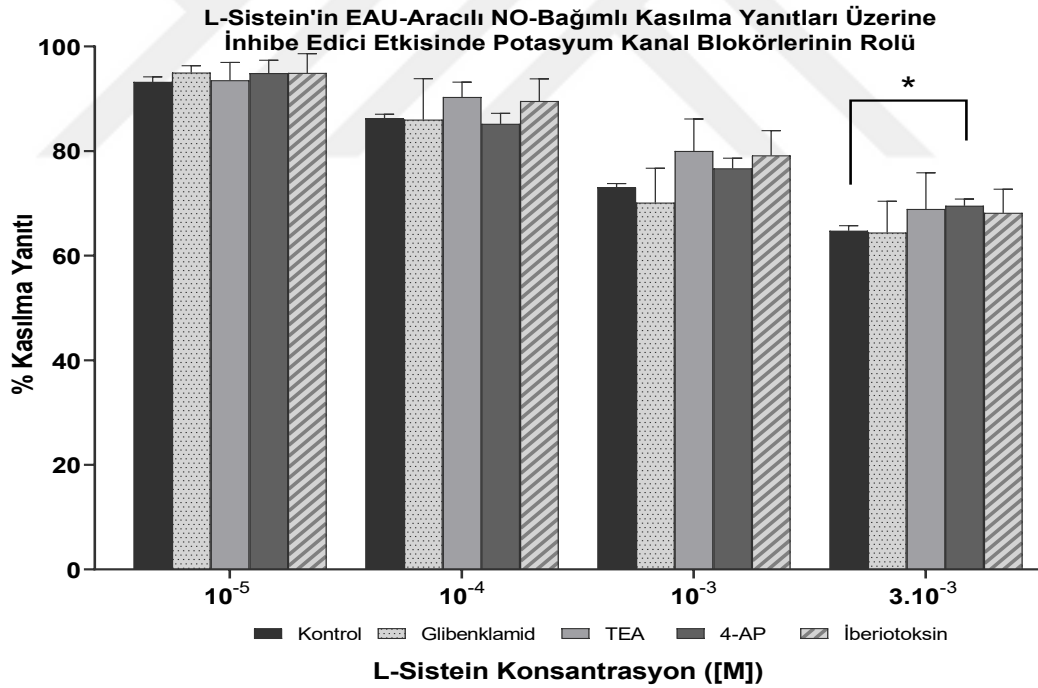
(NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10⁻⁶ M), indometasin (10⁻⁵ M) ve L-NAME (10⁻⁴ M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Kontrole göre anlamlılık *, p<0.05, tüm gruplar n=6)

4.5. EAU aracılı NO-Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine L-Sistein'in Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:

Dokuların K_v kanal blokörü 4-AP (10^{-4} M) ile 20 dakika inkübasyonu, artan L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M) dozlarının EAU aracılı NO-bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini azalttı.

L-Sistein 3×10^{-3} M dozu, 4-AP (10^{-4} M) varlığında istatistiksel olarak anlamlı ve konsantrasyona bağlı gevşeme gösterdi ($\% 30.46 \pm 1.29$, $p < 0.05$) (Şekil 4.5.1).

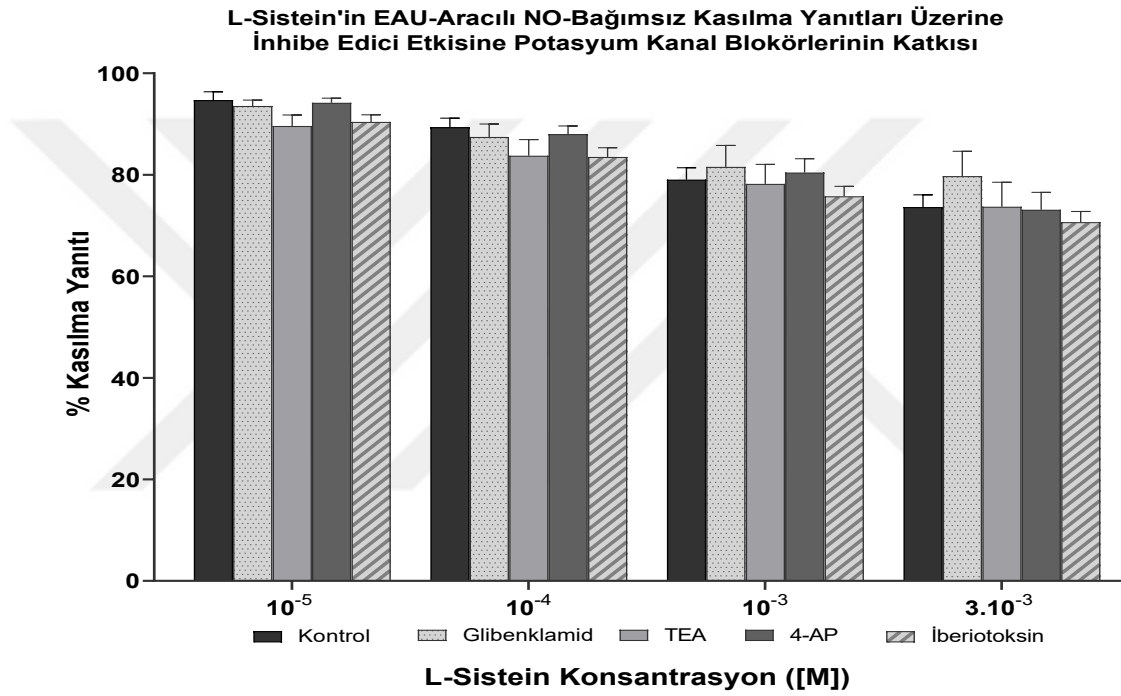
Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M), artan L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M) dozlarının EAU aracılı NO-bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini azalttı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir katkı sağlamadı.



Şekil 4.5 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı nörojenik kasılma yanıtları üzerine L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M) 'nin etkisi. (NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Kontrole göre anlamlılık *, $p < 0.05$, tüm gruplar $n=6$)

4.6. EAU aracılı NO-Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine L-Sistein'in Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:

Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M), artan dozlarda L-Sistein'in (10^{-5} - 3×10^{-3} M) EAU aracılı NO-bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini azalttı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir katkıda bulunmadı (Şekil 4.6.1).



Şekil 4.6 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız nörojenik kasılma yanıtları üzerine L-Sistein (10^{-5} - 3×10^{-3} M) 'nin etkisi.

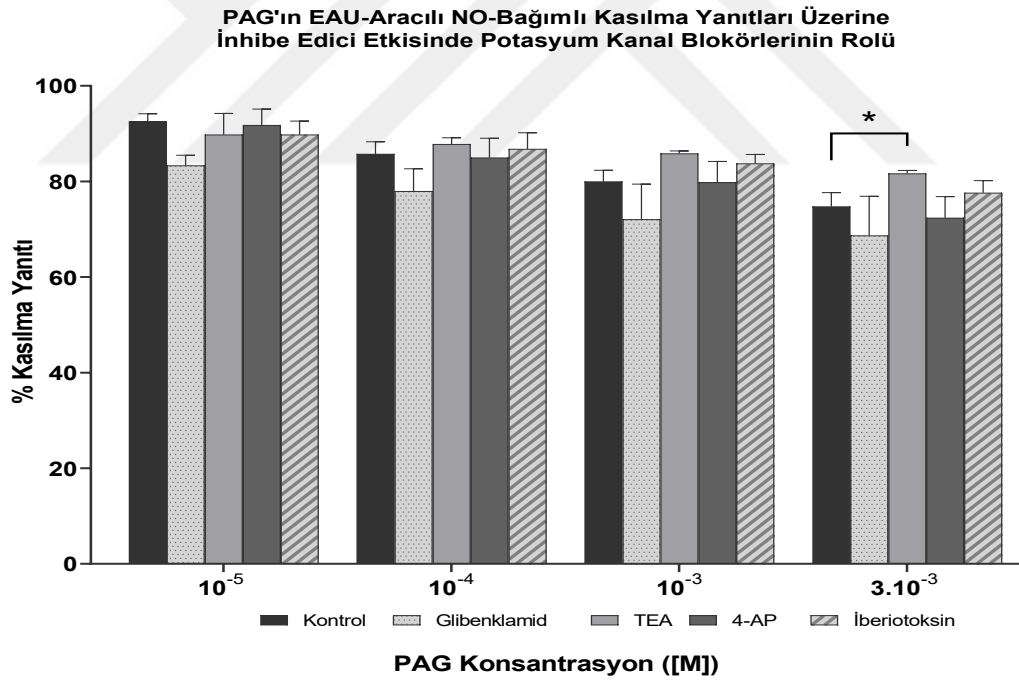
(NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. n=6).

4.7. EAU aracılı NO-Bağımlı Kasılma Yanıtları Üzerine H₂S Sentez İnhibitörlerinin Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:

Dokuların non-selektif K⁺ kanal blokörü TEA (10⁻⁴ M) ile 20 dakika inkübasyonu, artan PAG (10⁻⁵-3x10⁻³ M) dozlarının EAU aracılı NO-bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini azalttı.

Enzim inhibitörü PAG 3x10⁻³ M dozu, TEA (10⁻⁴ M) varlığında istatistiksel olarak anlamlı ve konsantrasyon bağımlı gevşeme gösterdi (%18.32± 1.74, p<0.05) (Şekil 4.7.1).

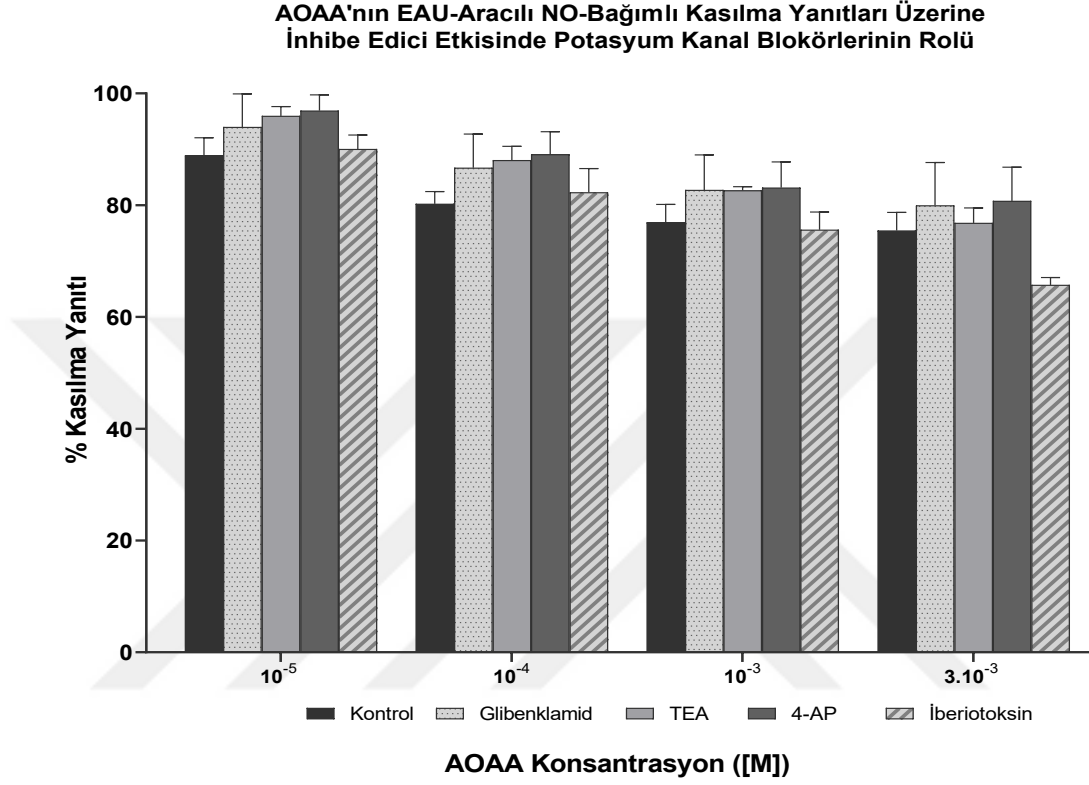
Glibenklamid (10⁻⁶ M), 4-AP (10⁻⁴ M) ve İberiotoksin (10⁻⁸ M), artan PAG (10⁻⁵-3x10⁻³ M) dozlarının EAU aracılı NO-bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini değiştirdi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir katkısı olmadığı bulundu.



Şekil 4.7.1 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10⁻⁶ M), TEA (10⁻⁴ M), 4-AP (10⁻⁴ M) ve İberiotoksin (10⁻⁸ M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı nörojenik kasılma yanıtları üzerine PAG (10⁻⁵- 3x10⁻³ M)'ın etkisi.

(NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10⁻⁶ M) ve indometasin (10⁻⁵ M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi. Kontrole göre anlamlılık *, p <0.05, tüm gruplar n=6).

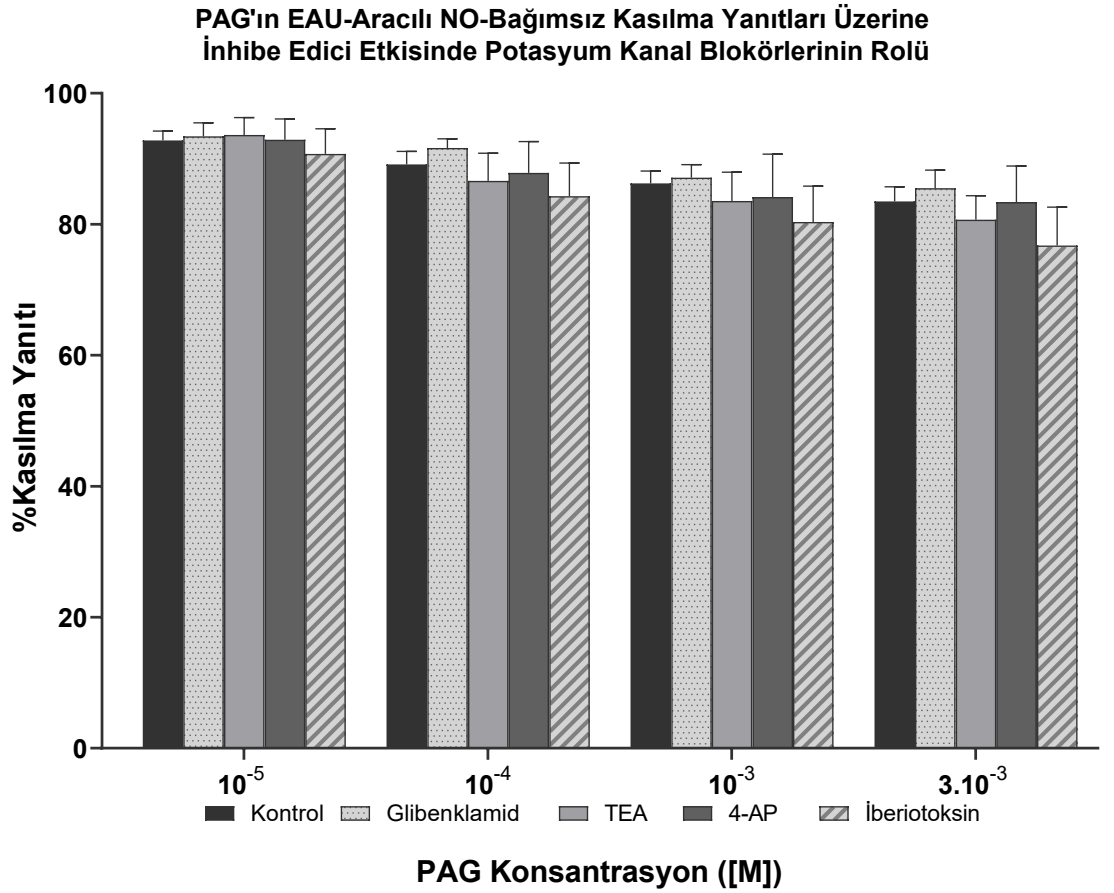
Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M), artan AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M) dozlarının EAU aracılı NO-bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini değiştirdi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir katkısı olmadığı bulundu (Şekil 4.7.2).



Şekil 4.7.2 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımlı nörojenik kasılma yanıtları üzerine AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M) 'ın etkisi. (NO bağımlı kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M) ve indometasin (10^{-5} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi, n=6)

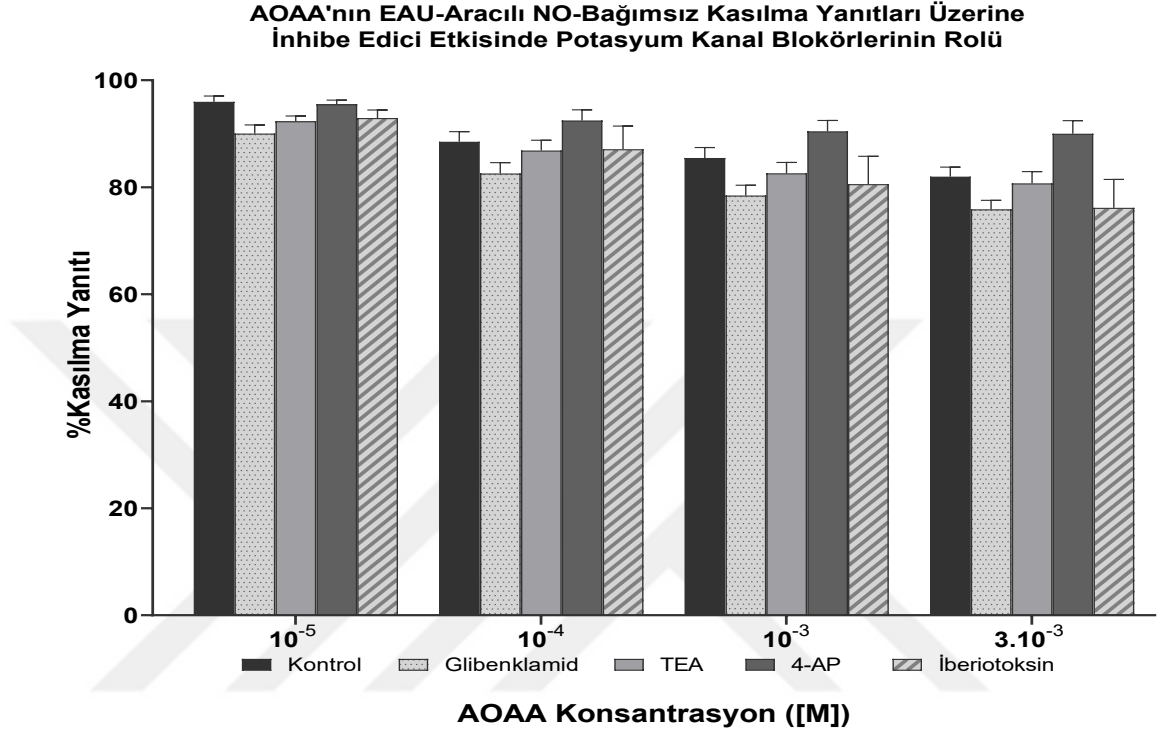
4.8. EAU aracılı NO-Bağımsız Kasılma Yanıtları Üzerine H₂S Sentez İnhibitörlerinin Etkisinde Potasyum Kanal Blokörlerinin Rolü:

Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M), artan PAG (10^{-5} - 3×10^{-3} M) dozlarının EAU aracılı NO-bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini değiştirdi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir katkısı olmadığı bulundu (Şekil 4.8.1).



Şekil 4.8.1 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız nörojenik kasılma yanıtları üzerine PAG (10^{-5} - 3×10^{-3} M) 'in etkisi. (NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi, n=6).

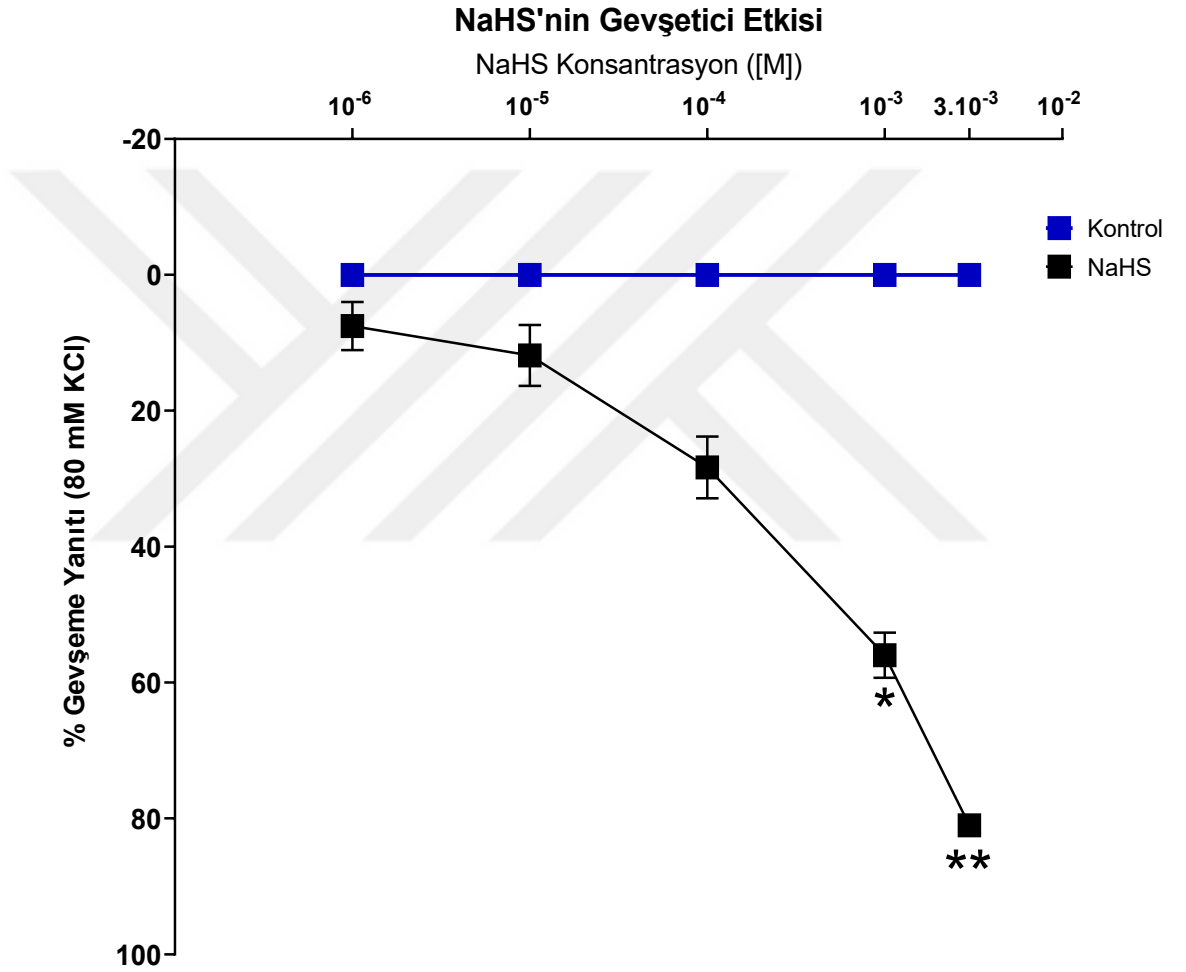
Potasyum kanal blokörleri, Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M), artan AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M) dozlarının EAU aracılı NO-bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki gevşetici etkisini değiştirdi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir katkısı olmadığı bulundu (Şekil 4.8.2).



Şekil 4.8.2 Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid (10^{-6} M), TEA (10^{-4} M), 4-AP (10^{-4} M) ve İberiotoksin (10^{-8} M) varlığında, EAU aracılı NO bağımsız nörojenik kasılma yanıtları üzerine AOAA (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'ın etkisi. (NO bağımsız kasılma yanıtları guanetidin (10^{-6} M), indometasin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) varlığında alındı. Kasılma yanıtları kontrol kasılma yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edildi, n=6).

4.9. Ekzojen Potasyum Klorür (KCl) ve Kalsiyum (Ca²⁺) ile Oluşan Kasılma Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi:

Potasyum klorür (KCl, 80 mM) ve kalsiyum (Ca²⁺, 2,5 mM) ile kastırılmış olan alt özefagus sfinkter dokularında NaHS istatistiksel olarak anlamlı bir gevşemeye neden olurken (81.01% ± 1.53; p<0.05; n=5). L-Sistein, PAG ve AOAA istatistiksel olarak anlamlı bir gevşemeye neden olmadı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 80 mM KCl ile kastırılmış dokularda NaHS (10⁻⁶-3x10⁻³ M)'in gevşetici etkisi.

(Gevşeme yanıtları guanetidin (10⁻⁶ M) ve indometasin (10⁻⁵ M) varlığında alındı. Gevşeme yanıtı 80mM KCl ile oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi (Kontrol grubuna göre anlamlılık *, p<0.01, **, p<0.001, n=6).

5. TARTIŞMA

Hidrojen sülfür'ün gastrointestinal sistem üzerinde inhibitör etkisine ilişkin literatür incelemesinden hareketle, sunulan çalışmada tavşan AÖS'sinde bu inhibe edici etkilerin altında yatan mekanizmaların NO bağımlı olup olmadığını araştırmak ve NO varlığında ve yokluğunda K^+ kanallarının katılımını incelemek amaçlanmaktadır. Bulgularımız, eksojen ve endojen H_2S inhibitör etkisinin K_v kanalları ve NO ile ilişkili olduğunu göstermiştir. NO ve H_2S 'in AÖS düz kasında etkileşime girerek birbirlerinin etkilerini arttırdığını ve NO'nun EAU ile indüklenen kasılma yanıtları üzerinde L-Sistein/ H_2S yolağı aracılı inhibisyonunun bir bileşeni olabileceğini düşünüyoruz.

Bu çalışmada EAU aracılı kasılma cevapları üzerinde sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin ve siklooksijenaz inhibitörü indometasin istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadi. Muskarinik reseptör antagonisti atropin, EAU aracılı kasılma cevaplarını tamamen inhibe ederken, bir antikolinesteraz olan neostigmin EAU aracılı kasılma cevaplarını artırdı. Ayrıca NOS inhibitörü L-NAME'in AÖS dokularında kasılma cevaplarını arttırdığı önceki çalışmamız ile uyumlu şekilde, EAU aracılı kasılma cevaplarını önemli ölçüde artırdı. Knudsen ve ark. yaptıkları çalışmada AÖS'nin gevşemesi için nitreerjik transmisyonun düzenleyici olabileceğini ilk defa ileri sürmüşlerdir (Tøttrup vd., 1991). Sonuçlarımız, kolinerjik ve nitreerjik bileşenlerin AÖS kasılma cevaplarının oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Bu çalışmada alt özefagus sfinkteri dokusunda potasyum kanalları alt tiplerinin NaHS, L-Sistein ve H_2S sentez inhibitörleri PAG ve AOAA'nın EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine inhibitör etkisindeki rolü ilk defa araştırılmıştır. Bu inhibisyon yanıtlarına NO etkisi NOS inhibitörü L-NAME varlığında, K^+ kanallarının katkısı ise K^+ kanal blokörleri varlığında araştırılmıştır. Yaptığımız bu çalışma (1) eksojen H_2S , L-sistein ve H_2S sentez inhibitörlerinin inhibitör etkisinin NOS inhibitörü L-NAME varlığında azaldığı; (2) eksojen H_2S 'in inhibitör etkisine non-selektif K kanalları ve K_v kanallarının katkıda bulunduğu; (3) NOS inhibitörü L-NAME varlığında, eksojen H_2S 'in inhibitör etkisine non-selektif K kanallarının katkısı olduğu; (4) L-sistein

aracılı inhibitör yanıtlara voltaj bağımlı Kv kanallarının katkıda bulunduğu, fakat K_{ATP} , K_v , K_{non} katkısının olmadığı; (6) NOS inhibitörü L-NAME varlığında, L-Sistein'in inhibitör etkisine potasyum kanallarının katkısının bulunmadığı; (7) PAG aracılı inhibitör yanıtlara non-selektif K kanallarının katkısının olduğu; (8) NOS inhibitörü L-NAME varlığında, PAG'ın inhibitör etkisine potasyum kanallarının katkısının bulunmadığı; (8) AOAA aracılı inhibitör yanıtlara K_{ATP} , K_v , K_{non} , K_{Ca} kanallarının katkısının olmadığını göstermiştir.

Daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarla da benzer şekilde, tavşan alt özefagus sfinkter dokusu, EAU aracılı bifazik kasılma yanıtlarına aracılık etmiştir. Önceki çalışmamızda, NaHS'nin (10^{-6} - 3×10^{-3} M) bifazik EAU yanıtları üzerindeki inhibitör etkisini ilk kez gösterdik (Kara, Halil vd., 2016). Eksojen H_2S donörü NaHS, kobay ileumu, tavşan ve sıçan ileumu ve sıçan jejunumunda yapılan çalışmalarda konsantrasyona bağlı gevşemeye neden oldu. Dhaese ve ark. yaptığı çalışmada, NaHS'nin PGF(2alfa) ile kasılmış fare fundusu ve distal kolonu kas şeritleri üzerine gevşetici etkisi gösterilmiştir.

Bu çalışmada, NaHS bütün dokularda, doza bağlı şekilde EAU aracılı nörojenik kasılma cevaplarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı. Daha önceki çalışmamıza benzer şekilde, NaHS uygulaması, EAU'nın neden olduğu kasılma cevaplarını yaklaşık %80 oranında inhibe ettiğini ve bu inhibitör etkinin zamanla azaldığını gözlemledik. Her iki çalışmada da NaHS'nin 80 mM KCl ile kastırılmış dokularda inhibitör etkisi ortaya konmuştur (Kara, Halil vd., 2016). Ancak, NaHS'nin inhibitör etkisi KCl ile önceden kasılmış dokularda zamanla azalmamıştır. Çalışmamız, NaHS'nin EAU'ya cevap olarak sinir terminallerinde presinaptik mekanizmalar aracılığıyla etki ettiğini ortaya koymuştur ilave olarak sonuçlarımız, NaHS'nin post-sinaptik mekanizmalar aracılı da etki edebileceğini öngörmektedir.

İn vivo çalışmalardan elde edilen çok sayıda kanıt NO'nun, AÖS'nin esas inhibitör nörotransmitteri olduğunu göstermiştir (Farré & Sifrim, 2008; Kuramoto vd., 2013; Kwiatek & Kahrilas, 2012; Lecea vd., 2011). NO, alt özefagus sfinkteri (González vd., 2004; Lecea vd., 2011), mide (Andrews vd., 2007; Tonini vd., 2000), internal anal sfinkter (O'Kelly vd., 1993) ve kolon (Mañé vd., 2014) dahil olmak üzere GI sistemde gevşetici etkilere aracılık eder. Keseli sıçan, kobay ve farenin AÖS düz

kasında yapılan çalışmalarda, membran hiperpolarizasyonunun kontrolünü sağlayan nörotransmitter olduğu gösterilmiştir (Imaeda vd., 1998; Imaeda & Cunnane, 2003; Y. Zhang & Paterson, 2003). Bu çalışmada, NOS inhibitörü L-NAME'in AÖS düz kasının gerilimini azalttığı gösterilmiştir. Nitrik oksitten bağımsız, L-NAME inkübe edilen dokularda, NaHS'nin gevşetici etkisindeki olağanüstü inhibisyon, literatür tarafından desteklenen H₂S ve NO arasındaki etkileşimi ortaya koymuştur (Ali vd., 2006; Bucci vd., 2012). Meng ve ark. yaptığı çalışma, gastrik fundus düz kas hücrelerinde H₂S ve NO sentazların birlikte eksprese edildiğini, NO'nun düz kas gerimini azaltırken, H₂S'in düz kas gerimini artırdığını göstermiştir. H₂S etkisine kısmen NOS inhibisyonunun aracılık ettiğini belirtmişlerdir (X. Meng vd., 2017). Literatürdeki veriler H₂S'in inhibisyon etkisinde NOS varlığının önemini ortaya koymuştur. Bulgularımız, literatürü destekleyen şekilde, NO'nun, NaHS'nin AÖS düz kas üzerindeki inhibitör etkisine katkısı olduğunu ortaya koymaktadır.

L-Sistein, endojen H₂S sentezi için başlıca öncüdür. Çalışmamızda, H₂S öncülü L-Sistein, bütün dokularda, doza bağlı şekilde EAU aracılı nörojenik kasılma cevaplarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı. L-Sistein' in inhibitör etkisi, tavşan midesi, tavşan AÖS' sindeki nörojenik kasılmalar, insan AÖS'sinde muskarinik kasılmalar ve insan kolonundaki spontan kasılmalar üzerinde gösterilmiştir (Kara, Halil vd., 2016; Martinez-Cutillas vd., 2015; Nalli vd., 2017).

Nitrik oksitten bağımsız, L-NAME inkübe edilen dokularda, L-Sistein' in inhibitör etkisinin azaldığını bulduk. Bu sonuçlarla uyumlu olarak NO, L-Sistein alımını artırarak endojen H₂S üretimini artırmaktadır (R. Wang, 2002). Zhao ve ark. yaptığı çalışmada, eksojen NO donörleri CSE aktivasyonunu tetikleyerek endojen H₂S biyosentezini arttırmıştır (Weimin Zhao vd., 2003).

Vücuttaki doku ve organların çoğu H₂S sentezleyen enzimleri eksprese eder. Gİ sistemde hem sinirlerde hem de düz kaslarda endojen olarak H₂S üretilmektedir. Yapılan çalışmalar, sıçan ve kobay kolonunun enterik sinirlerinde ve sıçan kolonunun düz kas hücrelerinde H₂S sentezleyici enzimlerin varlığı ile endojen sentezi ortaya konmuştur. Ayrıca CSE ve CBS enzimlerinin farelerin gastrik düz kaslarında ve insan yemek borusu ve AÖS'sinde de ekspresyonu gösterilmiştir (Hennig & Diener, 2009; X. M. Meng vd., 2015; Quan vd., 2015; Schicho vd., 2006; L. Zhang vd., 2016).

PAG ve AOAA bileşikleri, sırasıyla CSE ve CBS enzimleri için kompetitif, geri-dönüşsüz ve selektif inhibitörler olarak kabul edilir (Petrosino vd., 2022; Whiteman vd., 2011). PAG ve AOAA, aminotransferazlar dahil olmak üzere çeşitli PLP'ye bağımlı enzimleri de hedefleyebilmesi ve AOAA'nın 8 kat daha fazla CSE enzim inhibisyonu göstermesine rağmen bu ajanlar, alternatif güçlü ve hücre geçirgen spesifik inhibitörlerin yokluğu nedeniyle hala hücre kültürü ve deneysel hayvan araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Asimakopoulou vd., 2013; Zuhra vd., 2020).

Çalışmamız, sırasıyla CBS ve CSE inhibitörleri olan AOAA ve PAG'ın, L-Sistein tarafından elde edilen gevşemeden daha az, tavşan AÖS'sinde konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisini göstermiştir. H₂S'in endojen sentezinin, önceki çalışmamızın sonuçlarına uygun olarak AOAA ve PAG tarafından kısmen inhibe edildiğini öneriyoruz. Bu nedenle, tavşan AÖS'sinde H₂S üretiminden sorumlu enzimleri aydınlatmak için daha fazla araştırma yapılması gerekli görülmektedir.

Bu çalışmada AOAA ve PAG'ın EAU aracılı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisinin NO bağımsız gruplarda, NO bağımlı gruplara göre azaldığı bulundu. Bulgular, NO'nun tavşan AÖS dokusunda endojen H₂S sentezinin etkisine doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Birçok dokunun düz kaslarının H₂S ile indüklenen gevşemesinde K⁺ kanallarının kritik rolü açıkça ortaya konmuştur. Bu çalışmada, ilk kez, AÖS dokusunun H₂S ile indüklenen gevşemesinde çeşitli K⁺ kanallarının rolü incelenmiştir. Marinko ve ark., NaHS'nin, NO yolağının aktivasyonu aracılığıyla, insan safen damarı üzerindeki gevşetici etkisini ve buna BK_{Ca} ve K_{ATP} kanallarının katkısı olduğunu ortaya koymuştur (Marinko vd., 2021). Ren ve ark., BK_{Ca} kanal blokörü iberoiotoksinin sıçan kolonu düz kasının gevşemesini azalttığını gösterdi (Ren vd., 2016). Bir K_{ATP} kanal blokörü olan glibenklamid, sıçan mide pilorik sfinkter dokularında NaHS ile indüklenen gevşemeyi tersine çevirdi (Medeiros vd., 2012).

Gastrointestinal sistemin düz kas hücrelerinde, K_V kanallarının ekspresyonu gösterilmiştir. H₂S'in etkileri mide fundus dokusunda K_V kanal blokörü 4-AP tarafından (X. M. Meng vd., 2015) ve mide düz kasında non-selektif K⁺ kanal blokörü

TEA (P. Zhao vd., 2009) ile tersine çevrilmiştir. Bai ve ark. yaptığı çalışmada, 1 mM TEA varlığında, domuz AÖS dokularında NaHS ile indüklenen gevşemeyi azalttığı bulunmuştur (Bai vd., 2018). Bu bulgulara dayanarak, K^+ kanallarının NaHS'nin indüklediği inhibitör etkideki rolünü araştırmaya karar verdik.

AÖS şeritlerinin non-selektif K^+ kanal blokörü TEA ile ön tedavi uygulaması ile NaHS'nin inhibitör etkisi azalırken, K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid sonuçları etkilememiştir. TEA, non-selektif bir K_V ve BK_{Ca} kanal blokörüdür. Bu iki K^+ kanal tipinin de GİS'te eksprese edildiği bilinmektedir (Cosme vd., 2020). NaHS'nin inhibitör etkisinde rolü olan K^+ kanallarını araştırmak amacıyla, seçici bir BK_{Ca} kanal blokörü olan iberiotoksin ve seçici bir K_V kanal blokörü olan 4-AP'yi kullandık. AÖS şeritlerinin iberiotoksin ile inkübasyonunun NaHS'nin indüklediği inhibisyon üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını bulduk. Öte yandan, AÖS şeritlerinin 4-AP ile inkübasyonu, NaHS'nin indüklediği inhibisyonu önemli ölçüde azalttı. Bu çalışma, K_V kanallarının tavşan AÖS'sinde NaHS ile indüklenen inhibisyona katkıda bulunduğuna dair ilk kanıtı sağladı.

İkinci olarak, AÖS dokularında L-Sistein ile indüklenen inhibitör etkide çeşitli K^+ kanallarının rolünü araştırdık. Elmoneim ve ark. sıçan korpus kavernozaumu (CC) üzerinde yaptığı bir çalışmada 4-AP ve TEA varlığının L-Sistein'in indüklediği gevşemeyi azalttığı görülmüştür (Abd Elmoneim vd., 2017). NaHS'nin indüklediği gevşetici etki, fare mezenterik arterinde K_{Ca} 'nın blokajıyla inhibe edilmiştir (Hart, 2020). İnsan miyometriyum şeritlerinin bir K_{ATP} kanal blokörü olan glibenklamid ile ön tedavisi, L-Sistein'in inhibe edici etkisini ortadan kaldırmıştır (You vd., 2011). Bu bulgulara dayanarak, K^+ kanallarının L-Sisteinin indüklediği inhibisyondaki rolünü araştırmaya karar verdik.

Bu çalışmada, L-Sistein'in inhibitör etkisi, AÖS şeritlerinin K_V kanal blokörü 4-AP inkübasyonu ile anlamlı düzeyde azaldı. Non-selektif K^+ kanal blokörü TEA ise L-Sisteinin indüklediği inhibisyonu azalttı ancak anlamsızdı. Ayrıca, glibenklamid ve iberiotoksin ile inkübasyonun L-Sistein'in indüklediği inhibisyonu etkilemedi. Bu sonuçlardan hareketle, K_V kanallarının tavşan AÖS'sinde L-Sistein'in indüklediği inhibisyona katkıda bulunduğunu ilk kez gösterdik.

Nitrik oksitten bağımsız ortamda ise, L-NAME inkübe edilen dokularda, L-Sistein'in inhibitör etkisi, K^+ kanal blokörlerinin varlığından etkilenmedi. Bu sonuçlardan hareketle, L-Sistein'in, araştırdığımız kanalların dışında kalan etkileşimler ile de inhibisyon üretebileceği ve daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliği düşünülmüştür.

Son olarak bir diğer grupta, endojen H_2S sentez inhibitörleri AOAA ve PAG'ın inhibitör etkisine K^+ kanallarının katkısını araştırdık. Han ve ark. yaptığı çalışmada, fare gastrik düz kas dokusunda ve hücrelerinde gecikmiş doğrultucu voltaj bağımlı potasyum kanallarının ($IK_{(V)}$) CBS enzim inhibitörü AOAA'nın kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisindeki rolü, 4-AP varlığında gösterilmiştir (Han vd., 2011). Bu bulgulara dayanarak, EAU aracılı kasılma cevapları üzerinde PAG ve AOAA'nın inhibitör etkisinde K^+ kanallarının rolünü araştırmaya karar verdik. NO-bağımlı gruplarda, PAG'ın inhibitör etkisi, sadece non-selektif K^+ kanal blokörü TEA varlığında önemli ölçüde azaldı. Ayrıca NO-bağımlı ve bağımsız gruplarda K^+ kanal blokörlerinin AOAA'nın inhibitör etkilerini etkilemediğini bulduk.

Hidrojen sülfür'ün düz kas kontraktilesi üzerinde ikili bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Yüksek NaHS konsantrasyonları (0,3-1,0 mmol/L) spontan kasılmaların genliğini inhibe ederken, düşük konsantrasyonlar (0,1-0,3 mmol/L) tonik kasılmayı indükler (P. Zhao vd., 2009). H_2S 'in, in vitro çalışmalarda 1 μM -10 mM gibi geniş bir aralıkta uygulandığı bilinmektedir (Al-Magableh & Hart, 2011; Cheang vd., 2010). Mevcut çalışmamızda, NaHS, L-Sistein, PAG ve AOAA'nın konsantrasyona bağlı etkileri yüksek konsantrasyonlarda anlamlı bulunmuştur. Verilerimiz bu sonuçlarla tutarlı görünmekte ve literatürü desteklemektedir.

Hidrojen sülfür, memeli hücresinde endojen olarak üretilen gastrointestinal sistemde etkili bir sinyal molekülüdür. Çeşitli çalışmalar, H_2S 'in gastrointestinal motilitenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Özefagus peristaltizmi ve AÖS basıncının manometrik anormalliklerinin, , hiperkontraktıl özefagus, yaygın özefagus spazmı, fındikkıran özefagus ve diğer özefagus motilite bozuklukları gibi önemli hastalıkların nedeni olduğu düşünülmektedir. Patofizyolojik mekanizmalar, inhibitör ve uyarıcı nöronlar arasındaki dengesizliği, AÖS'nin gevşeme yetersizliğini ve özefagus gövdesinde aperistaltizmi içermektedir (Chuah vd., 2012).

Bu hastalıkların tedavisi semptomatiktir ve yaygın olarak nitratlar, kalsiyum kanal blokörleri ve sildenafil kullanılır. H_2S donörü NaHS'nin de GİS motilitesini inhibe ederek düz kasları gevşettiği bilinmektedir (Gallego vd., 2008; Gil vd., 2011; P. Zhao vd., 2009). Endojen ve eksojen H_2S 'in, gastrointestinal sistem AÖS dokusundaki inhibisyon cevabına K_V kanallarının katkıda bulunduğunu gösterdik. Ek olarak Gİ kanalda çeşitli mekanik duyarlı potasyum kanallarının normal gastrointestinal (GI) fonksiyon için gerekli olduğu bilinmektedir (H. Yang vd., 2022). Bu kanallardaki anormalliklerin Gİ bozukluklar veya hastalıklar ile ilişkili olduğu bilgisinden hareketle, çalışmamız K^+ kanallarının ilgili hastalıklardaki potansiyel rolü ve tedaviye olası katkısını araştırmak için yeni bir bakış açısı sağlamıştır.

Amberg ve ark. yaptığı çalışmada gastrik fundus düz kas hücrelerinde A- tip akımların K_{V4} kanalları aracılığıyla gerçekleştiği ve dinlenme membran potansiyelinin düzenlenmesinde $K_{V4.3}$ alt tipinin baskın olarak etkili olduğu gösterilmiştir (Amberg vd., 2021). Bu sonuçlardan hareketle çalışmamızda H_2S 'in AÖS'de inhibitör etki mekanizmasının K_V ile ilişkisinin ortaya koyduk ancak etki mekanizmasıyla ilişkili kanal alt tiplerinin bulunması için ileri araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Gastrik alt özofagus sfinkterinde yaptığımız çalışmada, NaHS, L-Sistein ve H_2S sentez enzim inhibitörleri (PAG ve AOAA) mikromolar ve milimolar konsantrasyonlarda etkili olmuştur ve diğer sistemlerdeki etkili konsantrasyonlarla tutarlıdır (Di Villa Bianca vd., 2009; Teague vd., 2002). Endojen H_2S fizyolojik seviyelerinin, farklı ölçüm yöntemleri kullanılarak çeşitli dokularda nanomolar ile mikromolar arasında değişebileceği bildirilmiştir (Kolluru ve ark., 2013). Sonuç olarak, AÖS düz kasındaki tam H_2S konsantrasyonu ve H_2S 'in düşük ve yüksek mikromolar seviyelerdeki fizyolojik ve patofizyolojik önemi yapılacak çalışmalarla belirlenmelidir.

Çalışmalar H_2S 'in GİS düz kası üzerindeki gevşetici etkisine, düz kas K^+ kanallarının aktivasyonu ve NO'nun doğrudan aracılık ettiğini ortaya koymuştur (Uc vd., 1999). Ayrıca bu çalışmada, eksojen H_2S tarafından indüklenen inhibisyonun K_V kanalları ve NO ile ilişkili olduğunu gösterdik. Bu nedenle, bu iki mekanizmanın kesiştiğini ve etkilerinin benzer sinyal iletim yolları aracılığıyla olabileceğini öneriyoruz.

Özetle, H_2S 'in AÖS'deki EAU aracılı nörojenik kasılma cevapları üzerindeki inhibitör etkileri, önceki çalışmamızın sonuçları ile tutarlıdır. H_2S 'in EAU' ya yanıt olarak sinir terminallerinde nörotransmitter salınımını etkilemiş olabileceği ve aynı konsantrasyonlarda KCl ile kasılmış dokularda inhibitör etkisinin benzer olması ve etkinin zamanla azalmaması eksojen H_2S 'in, sinir sonlanmalarından daha çok düz kas üzerinde postsinaptik bir etkisi olduğu ortaya konmuştur. Sonuçlarımız tavşan AÖS'sinde, NO ve K_v kanallarının eksojen H_2S NaHS'nin ve endojen H_2S öncüsü L-Sistein'in inhibitör etkisine katkısı olduğunu gösterdi. Bu nedenle, H_2S , GİS motilite bozukluklarının tedavisinde kullanılabilir bir spesifik hücresel hedef olarak düşünülebilir.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, daha önceki çalışmamızda bulduğumuz, H_2S 'in AÖS şeritlerinde yaptığı inhibisyon yanıtlarının etkilerini analiz etmek, etki mekanizmalarını araştırmak ve elektriksel alan uyarısına (EAU) bağlı nörojenik kasılma cevapları üzerine H_2S 'in etkisine potasyum (K^+) kanallarının katkısı ve nitrik oksit ile etkileşiminin araştırılması amaçlanmıştır.

Elektriksel alan uyarısı aracılı kasılma yanıtları üzerinde sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin salıverilmesini inhibe eden guanetidin ve siklooksijenaz inhibitörü indometasin istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadi. Muskarinik reseptör antagonisti, Atropin EAU aracılı kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı. Bir antikolinesteraz olan Neostigmin EAU aracılı kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırdı. Nitrik oksit sentaz inhibitörü, L-NAME, EAU aracılı kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırdı.

Ekzojen H_2S donörü, NaHS' nin, EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine inhibitör bir etkisi olduğu görüldü. Kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı. NaHS' nin inhibitör etkisi L-NAME varlığında, NO bağımsız ortamda azalırken, bu azaltıcı etkisi zamanla geri döndü.

Potasyum kanal blokörleri Glibenklamid ve İberiotoksin, NaHS' nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisini değıştirmedi. Bu sonuçlar EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerine K_{Ca} , K_{ATP} kanallarının katkısının olmadığını göstermektedir.

Potasyum kanal blokörleri 4-AP ve TEA, NaHS' nin EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisini azaltmıştır. Bu sonuçlar EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerine K_v ve non-selektif K^+ kanallarının katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

Glibenklamid, İberiotoksin ve 4-AP, NaHS' nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisini etkilemezken, TEA varlığında inhibisyon yanıtları azalmıştır. Bu sonuçlar NaHS' nin EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerine non-selektif K⁺ kanallarının katkısının olabileceğini düşündürmektedir.

L-Sistein, EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttı. L-Sistein' in EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine inhibitör etkisi, NO bağımsız ortamda azaldı.

Glibenklamid, İberiotoksin ve TEA, L-Sistein' in EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisini etkilemezken, 4-AP inhibisyon yanıtlarını azaltmıştır. Bu sonuçlar L-Sistein' in EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerine K_v kanallarının katkısının olabileceğini düşündürmektedir.

L-Sistein'in EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisine glibenklamid, iberiotoksin, TEA ve 4-AP'nin etkisi bulunmamıştır. Bu sonuçlar L-Sistein' in EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerine K_{Ca}, K_{ATP}, K_v ve non-selektif K⁺ kanallarının katkısının olmadığını göstermektedir.

Hidrojen sülfür sentez enzim inhibitörü PAG, EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtlarını azalttı. PAG'ın inhibitör etkisi, NO bağımsız ortamda azaldı. Glibenklamid, iberiotoksin ve 4-AP, PAG'ın EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtlarına inhibitör etkisini değiştirmedi, TEA inhibisyon yanıtlarını azaltmıştır. Bu sonuçlar PAG'ın EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerine non-selektif K⁺ kanallarının katkısının olabileceğini düşündürmektedir. PAG'ın EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisine glibenklamid, iberiotoksin, TEA ve 4-AP'nin etkisi bulunmamıştır. Bu sonuçlar PAG'ın EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerine K_{Ca}, K_{ATP}, K_v ve non-selektif K⁺ kanallarının katkısının olmadığını göstermektedir.

Diğer sentez enzim inhibitörü AOAA, EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtlarını azalttı. AOAA' nın inhibitör etkisi, NO bağımsız ortamda azaldı. Glibenklamid, İberiotoksin, TEA ve 4-AP, AOAA' nın EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtlarına inhibitör etkisini değiştirmiş ancak anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. AOAA' nın EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisine glibenklamid, iberiotoksin, TEA ve 4-AP'nın anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Bu sonuçlar, AOAA' nın EAU aracılı NO bağımlı ve bağımsız kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerine K_{Ca} , K_{ATP} , K_V ve non-selektif K^+ kanallarının katkısının olmadığını göstermektedir.

Non-selektif K^+ kanal blokörü TEA, NaHS ve PAG'ın EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerinde inhibitör etkilerini azaltmıştır. Buradan hareketle inhibisyon yanıtlarına non-selektif K^+ kanallarının katkısı olabileceğini ve bu kanalların NO ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Voltaj bağımlı K_V kanalların blokörü 4-AP, NaHS, L-Sistein'in EAU aracılı NO bağımlı kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkilerinin her ikisini de azaltmıştır. Ancak EAU aracılı NO bağımsız kasılma yanıtları üzerinde inhibitör etkilerine etkisiz bulunmuştur. Bu sonuçlardan hareketle, K_V kanallarının inhibitör yanıtların üzerindeki etkilerinin NO ile ilişkili olduğunu ve NO'nun, EAU aracılı kasılma yanıtları üzerine L-Sistein/ H_2S yolağı ile indüklenen inhibisyonun bir bileşeni olabileceğini düşündürmektedir.

Potasyum klorür (KCl, 80 mM) ve kalsiyum (Ca^{+2} , 2.5 mM) ile kastırılmış alt özefagus sfinkter dokularında, NaHS istatistiksel olarak anlamlı bir gevşemeye neden olurken, L-Sistein istatistiksel olarak anlamlı bir gevşemeye neden olmadı. PAG ve AOAA, dokularda gevşemeye neden olmadı. Bu sonuçlardan hareketle, H_2S 'in sinir sonlanmalarından daha çok düz kas üzerinde postsinaptik bir etki mekanizması olduğu ortaya konmuştur.

İn vivo ve in vitro çalışmalarda, farklı insan ve hayvan dokularında, H_2S 'in doza bağlı olarak yaptığı gevşemeler gösterilmiştir. Yine son çalışmalarda, H_2S 'in memeli dokusunda önemli miktarda sentezlendiği ve düzenleyici mediyatör olarak birçok fizyolojik etkisinin olduğu gösterilmiştir. GİS üzerinde yapılan çalışmalarda ise

gastrik mukozada endojen H_2S 'in sentezinde görevli CBS ve CSE enzimlerinin varlığı tespit edilmiştir. Ancak H_2S 'in düz kas üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılamamış, çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür.

Hidrojen sülfür'ün, izole tavşan AÖS dokusunda gevşetici etkisini ilk defa gösterdiğimiz önceki çalışmamızdan hareketle, düz kasta bulunan potasyum kanallarının gevşemedeki rolünün ortaya konması ve NO ile ilişkisi olup olmadığı daha önce araştırılmadığı için bu konudaki ilk çalışma olmuştur. Gastroözofageal hastalıkların patogenezi ve AÖS'nin rolü bilinmesine rağmen, aktivitesinin kontrolünde etkili mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu etki mekanizmaların tanımlanması, hastalıkların tedavi sürecine ışık tutacağı düşünülmektedir.

Bu nedenle potasyum kanal blokörleri varlığında, NO bağımlı ve bağımsız ayrı gruplarda, H_2S 'in salıvericisi NaHS'nin, H_2S öncülü L-Sistein'in ve H_2S sentez inhibitörleri PAG ve AOAA'nın gevşetici etki mekanizmaları incelenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulardan, ekzojen ve endojen üretilen H_2S 'in izole tavşan AÖS dokusunda gevşetici etkisi ortaya konmuştur. Bu gevşetici etkilerin NO ile ilişkisi, NO sentez inhibitörü L-NAME varlığında, potasyum kanalları ile olan ilişkisi non-selektif K^+ kanal inhibitörü TEA varlığında anlamlı bulunmuştur. Ayrıca K_v kanal inhibitörü 4-AP'nin ekzojen ve endojen üretilen H_2S 'in gevşetici etkisini anlamlı şekilde azalttığı bulunmuştur. PAG ve AOAA'nın gevşetici etkileri olduğu ortaya konmuştur. Bu gevşetici etkilerin NO ile ilişkisi NO sentez inhibitörü L-NAME varlığında, potasyum kanalları ile olan ilişkisi non-selektif K^+ kanal inhibitörü TEA varlığında anlamlı bulunmuştur.

7. KAYNAKLAR

- Abd Elmoneim, H., Sharabi, F., Mohy El Din, M., Louedec, L., Norel, X., & Senbel, A. (2017). Potassium channels modulate the action but not the synthesis of hydrogen sulfide in rat corpus cavernosum. *Life Sciences*, 189(May), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.09.013>
- Abe, K., & Kimura, H. . (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience*, 16(3), 1066-1071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
- Agis-Torres, Á., Recio, P., López-Oliva, M. E., Martínez, M. P., Barahona, M. V., Benedito, S., Bustamante, S., Jiménez-Cidre, M. Á., García-Sacristán, A., Prieto, D., Fernandes, V. S., & Hernández, M. (2018). Phosphodiesterase type 4 inhibition enhances nitric oxide-And hydrogen sulfide-mediated bladder neck inhibitory neurotransmission. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22934-1>
- Al-Magableh, M. R., & Hart, J. L. (2011). Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383(4), 403–413. <https://doi.org/10.1007/S00210-011-0608-Z>
- Alexander, S. P. H., Davenport, A. P., Kelly, E., Marrion, N., Peters, J. A., Benson, H. E., Faccenda, E., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., & Davies, J. A. (2015). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 172(24), 5744–5869. <https://doi.org/10.1111/BPH.13348/FULL>
- Ali, M. Y., Ping, C. Y., Mok, Y. Y. P., Ling, L., Whiteman, M., Bhatia, M., & Moore, P. K. (2006). Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *British Journal of Pharmacology*, 149(6), 625–634. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706906>
- Amberg, G. C., Koh, S. D., Imaizumi, Y., Ohya, S., & Sanders, K. M. (2003). A-type potassium currents in smooth muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 284(353-3). <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00301.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/H00331409006.JPEG>
- Amberg, G. C., Lee, J. Y., Koh, S. D., & Sanders, K. M. (2021). Characterization of the A-type potassium current in murine gastric fundus smooth muscles. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 321(4), C684–C693. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00247.2021>
- Andrews, C. N., Bharucha, A. E., Camilleri, M., Low, P. A., Seide, B., Burton, D., Baxter, K., & Zinsmeister, A. R. (2007). Nitroergic contribution to gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in healthy adults. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(5), 1359–1365. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00403.2006>
- Asimakopoulou, A., Panopoulos, P., Chasapis, C. T., Coletta, C., Zhou, Z., Cirino, G., Giannis, A., Szabo, C., Spyroulias, G. A., & 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. <https://doi.org/10.1111/BPH.12171>
- Bai, X., Ihara, E., Hirano, K., Tanaka, Y., Nakano, K., Kita, S., Iwamoto, T., Ogino, H., Hirano, M., Oda, Y., Nakamura, K., & Ogawa, Y. (2018). Endogenous

- Hydrogen Sulfide Contributes to Tone Generation in Porcine Lower Esophageal Sphincter Via Na⁺/Ca²⁺ Exchanger. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 5(3), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.11.004>
- Bains, K. N. S., Kashyap, S., & Lappin, S. L. (2021). *Anatomy, Thorax, Diaphragm - PubMed*. In: StatPearls . Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30137842/>
- Bennett, M. R. (1997). Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) transmission to smooth muscle: 35 years on. *Progress in Neurobiology*, 52(3), 159–195. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00012-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00012-9)
- Berenyiova, A., Grman, M., Mijuskovic, A., Stasko, A., Misak, A., Nagy, P., Ondriasova, E., Cacanyiova, S., Brezova, V., Feelisch, M., & Ondrias, K. (2015). The reaction products of sulfide and S-nitrosoglutathione are potent vasorelaxants. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 46, 123–130. <https://doi.org/10.1016/J.NIOX.2014.12.008>
- Berridge, M. J. (2014). Cell Signalling Biology. In *Portland Press*.
- Bertova, A., Cacanyiova, S., Kristek, F., Krizanova, O., Ondrias, K., & Tomaskova, Z. (2010). The hypothesis of the main role of H₂S in coupled sulphide-nitroso signalling pathway. *General Physiology and Biophysics*, 29(4), 402–410. https://doi.org/10.4149/GPB_2010_04_402
- Bian, K., & Murad, F. (2014). sGC-cGMP signaling: target for anticancer therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 814, 5–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1_2
- Blackshaw, L. A., Haupt, J. A., Omari, T., & Dent, J. (1997). Vagal and sympathetic influences on the ferret lower oesophageal sphincter. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 66(3), 179–188. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(97\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(97)00082-9)
- Braunstein, A. E., Goryachenkova, E. V., & Lac, N. D. (1969). Reactions catalysed by serine sulphydrase from chicken liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 171(2), 366–368. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90173-9](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90173-9)
- Breuillard, C., Cynober, L., & Moinard, C. (2015). Citrulline and nitrogen homeostasis: an overview. *Amino Acids*, 47(4), 685–691. <https://doi.org/10.1007/S00726-015-1932-2>
- Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C., Roviezzo, F., Brancalione, V., & Cirino, G. (2010). Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Inhibitor of Phosphodiesterase Activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(10), 1998–2004. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.209783>
- Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Zaid, A., Giannogonas, P., Cantalupo, A., Dhayade, S., Karalis, K. P., Wang, R., Feil, R., & Cirino, G. (2012). cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PloS One*, 7(12), e53319. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0053319>
- Bult, H., Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Jordaens, F. H., Maercke, Y. M. V., & Herman, A. G. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990 345:6273, 345(6273), 346–347. <https://doi.org/10.1038/345346a0>
- Chang, H. Y., Mashimo, H., & Goyal, R. K. (2003). Musings on the wanderer: What's new in our understanding of vago-vagal reflex? IV. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284 (347-3), 357–366.

- <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00478.2002>
- Chaudhry, S. R., & Bordoni, B. (2021). Anatomy, Thorax, Esophagus. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482513/>
- Chaussier, F. (1908). Précis d'expériences faites sur les animaux avec le gaz hydrogène sulfuré. *J Gen de Med, Chir et Pharm Paris*, 15, 19–39.
- Cheang, W. S., Wong, W. T., Shen, B., Lau, C. W., Tian, X. Y., Tsang, S. Y., Yao, X., Chen, Z. Y., & Huang, Y. (2010). 4-Aminopyridine-sensitive K⁺ channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery. *Vascular Pharmacology*, 53(3–4), 94–98. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2010.04.004>
- Chen, K. Y., & Morris, J. C. (1972). Kinetics of Oxidation of Aqueous Sulfide by O₂. *Environmental Science and Technology*, 6(6), 529–537. <https://doi.org/10.1021/es60065a008>
- Chen, X., Jhee, K. H., & Kruger, W. D. (2004). Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52082–52086. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400481200>
- Chen, Y. H., Yao, W. Z., Geng, B., Ding, Y. L., Lu, M., Zhao, M. W., & Tang, C. S. (2005). Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest*, 128(5), 3205–3211. <https://doi.org/10.1378/CHEST.128.5.3205>
- Christodoulides, N., Durante, W., Kroll, M. H., & Schafer, A. I. (1995). Vascular Smooth Muscle Cell Heme Oxygenases Generate Guanylyl Cyclase–Stimulatory Carbon Monoxide. *Circulation*, 91(9), 2306–2309. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.91.9.2306>
- Chuah, S. K., Hsu, P. I., Wu, K. L., Wu, D. C., Tai, W. C., & Changchien, C. S. (2012). 2011 update on esophageal achalasia. *World Journal of Gastroenterology*, 18(14), 1573–1578. <https://doi.org/10.3748/WJG.V18.I14.1573>
- Collman, P. I., Tremblay, L., & Diamant, N. E. (1992). The distribution of spinal and vagal sensory neurons that innervate the esophagus of the cat. *Gastroenterology*, 103(3), 817–822. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)90012-N](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)90012-N)
- Collman, P. I., Tremblay, L., & Diamant, N. E. (1993). The central vagal efferent supply to the esophagus and lower esophageal sphincter of the cat. *Gastroenterology*, 104(5), 1430–1438. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90352-D](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90352-D)
- Cosme, D., Estevinho, M. M., Rieder, F., & Magro, F. (2020). Potassium channels in intestinal epithelial cells and their pharmacological modulation: A systematic review. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 320, Issue 4, pp. C520–C546). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00393.2020>
- Curro, D. (2016). The Modulation of Potassium Channels in the Smooth Muscle as a Therapeutic Strategy for Disorders of the Gastrointestinal Tract. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 104, 263–305. <https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2015.12.002>
- D'Emmanuele di Villa Bianca, R., Mitidieri, E., Fusco, F., Russo, A., Pagliara, V., Tramontano, T., Donnarumma, E., Mirone, V., Cirino, G., Russo, G., & Sorrentino, R. (2016). Urothelium muscarinic activation phosphorylates CBS Ser227 via cGMP/PKG pathway causing human bladder relaxation through H₂S production. *Scientific Reports*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep31491>
- De Man, J. G., Pelckmans, P. A., Boeckxstaens, G. E., Bult, H., Oosterbosch, L., Herman, A. G., & Van Maercke, Y. M. (1991). The role of nitric oxide in

- inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter. *British Journal of Pharmacology*, 103(1), 1092–1096. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1991.TB12305.X>
- Di Villa Bianca, R. D. E., Sorrentino, R., Maffia, P., Mirone, V., Imbimbo, C., Fusco, F., De Palma, R., Ignarro, L. J., & Cirino, G. (2009). Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4513–4518. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0807974105>
- Dilek, O. N. (2012). Hiatal Herniler ve Özofagus. *Türkiye Klinikleri Genel Cerrahi*, 5(3), 29–35.
- Distrutti, E., Sediari, L., Mencarelli, A., Renga, B., Orlandi, S., Antonelli, E., Roviezzo, F., Morelli, A., Cirino, G., Wallace, J. L., & Fiorucci, S. (2006). Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(1), 325–335. <https://doi.org/10.1124/JPET.105.091595>
- Dogan, I., Bhargava, V., Liu, J., & Mittal, R. K. (2007). Axial stretch: A novel mechanism of the lower esophageal sphincter relaxation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00351.2006>
- Dombkowski, R. A., Russell, M. J., & Olson, K. R. (2004). Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 286(4 55-4). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00419.2003>
- Eşrefoğlu M. (2016). *Özel Histoloji. 2. Baskı*. İstanbul Tıp Kitabevi.
- Farré, R., & Sifrim, D. (2008). Regulation of basal tone, relaxation and contraction of the lower oesophageal sphincter. Relevance to drug discovery for oesophageal disorders. *British Journal of Pharmacology*, 153(5), 858–869. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707572>
- Farrugia, G., & Szurszewski, J. H. (2014). Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 147(2), 303–313. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.041>
- Filipovic, M. R., Miljkovic, J. L., Nauser, T., Royzen, M., Klos, K., Shubina, T., Koppenol, W. H., Lippard, S. J., & Ivanović-Burmazović, I. (2012). Chemical Characterization of the Smallest S-Nitrosothiol, HSNO; Cellular Cross-talk of H₂S and S-Nitrosothiols. *Journal of the American Chemical Society*, 134(29), 12016. <https://doi.org/10.1021/JA3009693>
- Fiorucci, S., Antonelli, E., Distrutti, E., Rizzo, G., Mencarelli, A., Orlandi, S., Zanardo, R., Renga, B., Di Sante, M., Morelli, A., Cirino, G., & Wallace, J. L. (2005). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology*, 129(4), 1210–1224. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.07.060>
- Fukuto, J. M., Chiang, K., Hszieh, R., Wong, P., & Chaudhuri, G. (1992). The pharmacological activity of nitroxyl: a potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/or endothelium-derived relaxing factor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263(2).
- Furne, J., Saeed, A., & Levitt, M. D. (2008). Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5). <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.90566.2008>

- Gallego, D., Clavé, P., Donovan, J., Rahmati, R., Grundy, D., Jiménez, M., & Beyak, M. J. (2008). The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 20(12), 1306–1316. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2008.01201.X>
- Gil, V., Gallego, D., & Jiménez, M. (2011). Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *British Journal of Pharmacology*, 164(2b), 485–498. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01431.X>
- González, A. A., Farré, R., & Clavé, P. (2004). Different responsiveness of excitatory and inhibitory enteric motor neurons in the human esophagus to electrical field stimulation and to nicotine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(1 50-1), 299–306. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00534.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30070417420007.JPEG>
- Goyal, R. K., & Rattan, S. (1975). Nature of the vagal inhibitory innervation to the lower esophageal sphincter. *Journal of Clinical Investigation*, 55(5), 1119–1126. <https://doi.org/10.1172/JCI108013>
- Goyal, Raj K., & Chaudhury, A. (2008). Physiology of normal esophageal motility. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(5), 610–619. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31816b444d>
- Grizel, A. V., Glukhov, G. S., & Sokolova, O. S. (2014). Mechanisms of Activation of Voltage-Gated Potassium Channels. *Acta Naturae*, 6(4), 10. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-10-26>
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 473–508. <https://doi.org/10.1124/PR.57.4.10>
- Hambidge, K. M., Krebs, N. F., & Miller, L. (1998). Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(2 Suppl). <https://doi.org/10.1093/AJCN/68.2.410S>
- Han, Y. F., Huang, X., Guo, X., Wu, Y. S., Liu, D. H., Lu, H. L., Kim, Y. C., & Xu, W. X. (2011). Evidence that endogenous hydrogen sulfide exerts an excitatory effect on gastric motility in mice. *European Journal of Pharmacology*, 673(1–3), 85–95. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2011.10.018>
- Hart, J. L. (2020). Vasorelaxation elicited by endogenous and exogenous hydrogen sulfide in mouse mesenteric arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(4), 551–564. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01752-w>
- Hartle, M. D., & Pluth, M. D. (2016). A practical guide to working with H₂S at the interface of chemistry and biology. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 45, Issue 22, pp. 6108–6117). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6cs00212a>
- Heitzmann, D., & Warth, R. (2008). Physiology and pathophysiology of potassium channels in gastrointestinal epithelia. *Physiological Reviews*, 88(3), 1119–1182. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00020.2007>
- Hennig, B., & Diener, M. (2009). Actions of hydrogen sulphide on ion transport across rat distal colon. *British Journal of Pharmacology*, 158(5), 1263–1275. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2009.00385.X>
- Hershcovici, T., Mashimo, H., & Fass, R. (2011). The lower esophageal sphincter.

- Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 23(9), 819–830.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2011.01738.X>
- Hildebrandt, T. M. (2011). Modulation of sulfide oxidation and toxicity in rat mitochondria by dehydroascorbic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(9), 1206–1213.
<https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2011.06.003>
- Hirata, I., Naito, Y., Takagi, T., Mizushima, K., Suzuki, T., Omatsu, T., Handa, O., Ichikawa, H., Ueda, H., & Yoshikawa, T. (2011). Endogenous hydrogen sulfide is an anti-inflammatory molecule in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(5), 1379–1386.
<https://doi.org/10.1007/S10620-010-1461-5>
- Hong, S. J., Roan, Y. F., & Chang, C. C. (1997). Spontaneous activity of guinea pig ileum longitudinal muscle regulated by Ca(2+)-activated K⁺ channel. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 272(5), G962–G971. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1997.272.5.G962>
- Hornby, P. J., & Abrahams, T. P. (2000). Central control of lower esophageal sphincter relaxation. *The American Journal of Medicine*, 108 Suppl 4a(4 SUPPL. 1), 90–98. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00345-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00345-9)
- Hosoki, R., Matsuki, N., & 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.
<https://doi.org/10.1006/BBRC.1997.6878>
- Huang, X., Meng, X. M., Liu, D. H., Wu, Y. S., Guo, X., Lu, H. L., Zhuang, X. Y., Kim, Y. C., & Xu, W. X. (2013). Different regulatory effects of hydrogen sulfide and nitric oxide on gastric motility in mice. *European Journal of Pharmacology*, 720(1–3), 276–285. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2013.10.017>
- Hughes, M. N., Centelles, M. N., & Moore, K. P. (2009). Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(10), 1346–1353. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.09.018>
- Hyland, N. P., Abrahams, T. P., Fuchs K, Burmeister M A, & Hornby P J. (2001). Organization and neurochemistry of vagal preganglionic neurons innervating the lower esophageal sphincter in ferrets - PubMed. *J Comp Neurol*, 430(2), 222–234. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11135258/>
- Ignarro, LJ, GM, B., KS, W., RE, B., & G, C. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), 9265–9269. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.24.9265>
- Imaeda, K., & Cunnane, T. C. (2003). Electrophysiological properties of inhibitory junction potential in murine lower oesophageal sphincter. *Journal of Smooth Muscle Research = Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi*, 39(5), 119–133.
<https://doi.org/10.1540/JSMR.39.119>
- Imaeda, K., Joh, T., Yamamoto, Y., Itoh, M., & Suzuki, H. (1998). Properties of inhibitory junctional transmission in smooth muscle of the guinea pig lower esophageal sphincter. *The Japanese Journal of Physiology*, 48(6), 457–465.
<https://doi.org/10.2170/JJPHYSIOL.48.457>
- Ingelfinger, F. J. (1971). The sphincter that is a sphinx. *The New England Journal of Medicine*, 284(19), 1095–1096.
<https://doi.org/10.1056/NEJM197105132841910>

- Ipavec, V., & Currò, D. (2015). Effects of Ca^{2+} -activated K^{+} channel modulators on the contractility of the rat gastric fundus. *Intrinsic Activity*, 3, 16–18. <http://www.intrinsicactivity.org/2015/3/S2/A4.2>
- Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X. N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., & Kimura, H. (2004). Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *The Biochemical Journal*, 381(Pt 1), 113–123. <https://doi.org/10.1042/BJ20040243>
- Jackson-Weaver, O., Paredes, D. A., Bosc, L. V. G., Walker, B. R., & Kanagy, N. L. (2011). Intermittent hypoxia in rats increases myogenic tone through loss of hydrogen sulfide activation of large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels. *Circulation Research*, 108(12), 1439–1447. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.228999>
- Jeffrey A.H, D. R. . (2000). Anatomy of the Esophagus. Thomas W.Shields, Joseps LoCicero, C.E Reed, R.H.Feins. In *General Thoracic Surgery, 5th edition* (pp. 1599-1608.).
- Jia, T., & Zhao, N. (2021). Expression and function of vasoactive intestinal peptide receptors in human lower esophageal sphincter. *Annals of Palliative Medicine*, 10(3), 3067077–3063077. <https://doi.org/10.21037/APM-21-193>
- Jiang, Y., Bhargava, V., & Mittal, R. K. (2009). Mechanism of stretch-activated excitatory and inhibitory responses in the lower esophageal sphincter. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(2). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00108.2009>
- Jimenez, M., Gil, V., Martinez-Cutillas, M., Mañé, N., & Gallego, D. (2017). Hydrogen sulphide as a signalling molecule regulating physiopathological processes in gastrointestinal motility. *British Journal of Pharmacology*, 174(17), 2805–2817. <https://doi.org/10.1111/bph.13918>
- Jin JY, Jin NG, Li Y, L. Z. & X. W. (2000). Effect of nitric oxide on electric and mechanical activities of gastric antral circular muscles in guinea pigs. *Acta Pharmacol Sin*, 21, 369–373.
- Kabil, O., Vitvitsky, V., Xie, P., & Banerjee, R. (2011). The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H_2S production in murine tissues. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(2), 363–372. <https://doi.org/10.1089/ARS.2010.3781>
- Kaneko, Y., Kimura, Y., Kimura, H., & Niki, I. (2006). L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*, 55(5), 1391–1397. <https://doi.org/10.2337/DB05-1082>
- Kara, Halil, Isli, F., Ozturk Fincan, G. S., Yildirim, S., Ercan, S., & Sarioglu, Y. (2016). The effects of hydrogen sulfide on electrical field stimulation-induced neurogenic contractile responses in isolated rabbit lower esophageal sphincter: Contribution of nitrenergic and non-adrenergic non-cholinergic transmission. *Pharmacological Reports*, 68(6), 1350–1357.
- Kawahara, H., Blackshaw, L. A., Lehmann, A., & Dent, J. (1997). Responses of the rat lower oesophageal sphincter (LOS) to vagal efferent activation. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 9(2), 85–97. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2982.1997.D01-24.X>
- Kew, J., & Davies, C. (2010). Ion channels : from structure to function. *Undefined*.
- Kimura, Y., Goto, Y. I., & Kimura, H. (2010). Hydrogen sulfide increases glutathione

- production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1089/ARS.2008.2282>
- Kimura, Y., & Kimura, H. (2004). Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(10), 1165–1167. <https://doi.org/10.1096/FJ.04-1815FJE>
- Kimura, Y., Koike, S., Shibuya, N., Lefer, D., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2017). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces potential redox regulators cysteine- and glutathione-persulfide (Cys-SSH and GSSH) together with signaling molecules H₂S₂, H₂S₃ and H₂S. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11004-7>
- Kito, Y., & Suzuki, H. (2007). Role of K(+) channels in the regulation of electrical spontaneous activity of the mouse small intestine. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 455(3), 505–514. <https://doi.org/10.1007/S00424-007-0306-3>
- Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* (Vol. 35, pp. 5–20). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.07.002>
- Kovac, J. R., Preiksaitis, H. G., & Sims, S. M. (2005). Functional and molecular analysis of L-type calcium channels in human esophagus and lower esophageal sphincter smooth muscle. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(6). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00529.2004>
- Kubo, S., Ichiko, D., Yuko, K., Hiroyuki, N., & Atsufumi, K. (2007). Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology*, 232(1–2), 138–146. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2006.12.023>
- Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C. G., Seino, S., & Vandenberg, C. A. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 509–526. <https://doi.org/10.1124/PR.57.4.11>
- Kuramoto, H., Kadowaki, M., & Yoshida, N. (2013). Morphological demonstration of a vagal inhibitory pathway to the lower esophageal sphincter via nitrergic neurons in the rat esophagus. *Neurogastroenterology and Motility*, 25(7), 7–9. <https://doi.org/10.1111/nmo.12146>
- Kwiatek, M. A., & Kahrilas, P. J. (2012). Physiology of the LES. *Diseases of the Esophagus*, 25(4), 286–291. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2011.01184.x>
- Lawson, K., & McKay, N. (2006). Modulation of Potassium Channels as a Therapeutic Approach. *Current Pharmaceutical Design*, 12(4), 459–470. <https://doi.org/10.2174/138161206775474477>
- Lecea, B., Gallego, D., Farré, R., Opazo, A., Aulí, M., Jiménez, M., & Clavé, P. (2011). Regional functional specialization and inhibitory nitrergic and nonnitrergic coneurotransmission in the human esophagus. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), 782–794. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00514.2009>
- Levitt, M. D., Abdel-Rehim, M. S., & Furne, J. (2011). Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: Anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(2), 373–378. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3525>

- Li, L., Rose, P., & Moore, P. K. (2011). Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 169–187. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010510-100505>
- Li, Lee, C., Martin, Z., Li, X., Koike, Y., Hock, A., Zani-Ruttenstock, E., Zani, A., & Pierro, A. (2017). Intestinal epithelial injury induced by maternal separation is protected by hydrogen sulfide. *Journal of Pediatric Surgery*, 52(1), 40–44. <https://doi.org/10.1016/J.JPESURG.2016.10.013>
- Liebermann-Meffert, D., Allgöwer, M., Schmid, P., & Blum, A. L. (1979). Muscular Equivalent of the Lower Esophageal Sphincter. *Gastroenterology*, 76(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(79\)80124-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(79)80124-9)
- Linden, D. R. (2014). *Hydrogen Sulfide Signaling in the Gastrointestinal Tract*. 20(5), 818–830. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5312>
- Linden, D. R., Levitt, M. D., Farrugia, G., & Szurszewski, J. H. (2010). Endogenous production of H₂S in the gastrointestinal tract: Still in search of a physiologic function. *Antioxidants and Redox Signaling*, 12(9), 1135–1146. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2885>
- Linden, D. R., Sha, L., Mazzone, A., Stoltz, G. J., Bernard, C. E., Furne, J. K., Levitt, M. D., Farrugia, G., & Szurszewski, J. H. (2008). Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1577–1585. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05502.x>
- Liu, Bai, X.-B., Shi, S., & Cao, Y.-X. (2009). Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia-reperfusion injury in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(2), 207–212. <https://doi.org/10.1211/JPP/61.02.0010>
- Liu, Y. H., Lu, M., Hu, L. F., Wong, P. T. H., Webb, G. D., & Bian, J. S. (2012). Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(1), 141–185. <https://doi.org/10.1089/ARS.2011.4005>
- Liu, Y. H., Yan, C. D., & Bian, J. S. (2011). Hydrogen sulfide: A novel signaling molecule in the vascular system. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 58(6), 560–569. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31820eb7a1>
- Liu, Y., Luo, H., Liang, C., Xia, H., Xu, W., Chen, J., & Chen, M. (2013). Actions of hydrogen sulfide and ATP-sensitive potassium channels on colonic hypermotility in a rat model of chronic stress. *PloS One*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0055853>
- Luiking, Y. C., Ten Have, G. A. M., Wolfe, R. R., & Deutz, N. E. P. (2012). Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 303(10). <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00284.2012>
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 7, Issue 2, pp. 156–167). Nat Rev Drug Discov. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>
- Maevisky, V., & Watson, T. J. (2009). Anatomy of the Esophagus. Thomas W. Shields, Joseps LoCicero, C.E Reed, R.H. Feins. In *General Thoracic Surgery, 7th edition* (pp. 1675-1682.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mañé, N., Gil, V., Martínez-Cutillas, M., Clavé, P., Gallego, D., & Jiménez, M. (2014). Differential functional role of purinergic and nitrergic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 212(4), 293–305. <https://doi.org/10.1111/APHA.12408>
- Marinko, M., Hou, H. T., Stojanovic, I., Milojevic, P., Nenezic, D., Kanjuh, V., Yang, Q., He, G. W., & Novakovic, A. (2021). Mechanisms underlying the vasorelaxant

- effect of hydrogen sulfide on human saphenous vein. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 35(5), 906–918. <https://doi.org/10.1111/FCP.12658>
- Martin, G. R., McKnight, G. W., Dickey, M. S., Coffin, C. S., Ferraz, J. G. P., & Wallace, J. L. (2010). Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 42(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/J.DLD.2009.05.016>
- Martinez-Cutillas, M., Gil, V., Mañé, N., Clavé, P., Gallego, D., Martin, M. T., & Jimenez, M. (2015). Potential role of the gaseous mediator hydrogen sulphide (H₂S) in inhibition of human colonic contractility. *Pharmacological Research*, 93, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.01.002>
- Matsuda, N. M., Lemos, M. C., & Feitosa, R. L. (2008). The effect of guanylate cyclase inhibitors on non-adrenergic and non-cholinergic neurogenic relaxations of the South American opossum lower esophageal sphincter. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 22(3), 299–304. <https://doi.org/10.1111/J.1472-8206.2008.00579.X>
- Medeiros, J. V. R., Bezerra, V. H., Gomes, A. S., Barbosa, A. L. R., Lima, R. C. P., Soares, P. M. G., Brito, G. A. C., Ribeiro, R. A., Cunha, F. Q., & De Souza, M. H. L. P. (2009). Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: Role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(3), 764–770. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.152801>
- Medeiros, J. V. R., Bezerra, V. H., Lucetti, L. T., P. Lima-Ju' nior, R. C. sar., R. Barbosa, A. L., Tavares, B. M., Magalhaes, P. J. C., Santos, A. A., Cunha, F. Q., Soares, P. M. G., & Souza, M. H. L. P. (2012). Role of KATP channels and TRPV1 receptors in hydrogen sulfide-enhanced gastric emptying of liquid in awake mice. *European Journal of Pharmacology*, 693, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.07.004>
- Meng, X., Huang, X., Lu, H., Zhang, C., Kim, Y., Chen, J., & Xu, W. (2017). H₂S-induced gastric fundus smooth muscle tension potentiation is mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. 7, 779–790. <https://doi.org/10.1113/EP086288>
- Meng, X., Huang, X., Zhang, C., Liu, D., Lu, H., Kim, Y., & Xu, W. (2015). Hydrogen sulfide-induced enhancement of gastric fundus smooth muscle tone is mediated by voltage-dependent potassium and calcium channels in mice. 21(16), 4840–4851. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i16.4840>
- Meng, X. M., Huang, X., Zhang, C. M., Liu, D. H., Lu, H. L., Kim, Y. C., & Xu, W. X. (2015). Hydrogen sulfide-induced enhancement of gastric fundus smooth muscle tone is mediated by voltage-dependent potassium and calcium channels in mice. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(16), 4840–4851. <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I16.4840>
- Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2011). Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochemical Journal*, 439(3), 479–485. <https://doi.org/10.1042/BJ20110841>
- Mikami, Y., Shibuya, N., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2013). Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ -lyase at the steady-state low intracellular Ca²⁺ concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(2), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.010>
- Mittal, R. (2011). Motor Function of the Pharynx, Esophagus, and its Sphincters.

- Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, 3(3), 1–84. <https://doi.org/10.4199/C00027ED1V01Y201103ISP016>
- Mittal, R. K. (1990). Current concepts of the antireflux barrier. *Gastroenterology Clinics of North America*, 19(3), 501–16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2228160/>
- Mittal, Ravinder K. (2016). Regulation and dysregulation of esophageal peristalsis by the integrated function of circular and longitudinal muscle layers in health and disease. In *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* (Vol. 311, Issue 3, pp. G431–G443). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00182.2016>
- Mittal, Ravinder K., & Goyal, R. K. (2006). Sphincter mechanisms at the lower end of the esophagus. *GI Motility Online, Published Online: 16 May 2006; | Doi:10.1038/Gimo14*. <https://doi.org/10.1038/GIMO14>
- Mittal, Ravinder K., Padda, B., Bhalla, V., Bhargava, V., & Liu, J. (2006). Synchrony between circular and longitudinal muscle contractions during peristalsis in normal subjects. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(3), G431–G438. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00237.2005>
- Mittal, Ravinder K., Zifan, A., Kumar, D., Ledgerwood-Lee, M., Ruppert, E., & Ghahremani, G. (2017). Functional morphology of the lower esophageal sphincter and crural diaphragm determined by three-dimensional high-resolution esophago-gastric junction pressure profile and CT imaging. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 313(3), G212–G219. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00130.2017>
- Muinuddin, A., Kang, Y., Gaisano, H. Y., & Diamant, N. E. (2004). Regional differences in L-type Ca²⁺ channel expression in feline lower esophageal sphincter. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(4). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00102.2004>
- Muinuddin, A., Neshatian, L., Gaisano, H. Y., & Diamant, N. E. (2004). Calcium source diversity in feline lower esophageal sphincter circular and sling muscle. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(2). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00291.2003>
- Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., & Snyder, S. H. (2011). Hydrogen Sulfide as Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor. *Circ Res*, 109(11), 1259–1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240242>
- Mustafa, Asif K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Barrow, R. K., Yang, G., Wang, R., & Snyder, S. H. (2009). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*, 2(96). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2000464>
- Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H., & Nishino, T. (1998). Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: Confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 110(3), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s004180050286>
- Nalli, A. D., Rajagopal, S., Mahavadi, S., Grider, J. R., & Murthy, K. S. (2015). Inhibition of RhoA-dependent pathway and contraction by endogenous hydrogen sulfide in rabbit gastric smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 308(6), C485–C495. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00280.2014>
- Nalli, A. D., Wang, H., Bhattacharya, S., Blakeney, B. A., & Murthy, K. S. (2017). Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway and smooth muscle contraction by

- hydrogen sulfide. *Pharmacology Research & Perspectives*, 5(5), e00343. <https://doi.org/10.1002/PRP2.343>
- Nicholls, P. (1975). Inhibition of cytochrome c oxidase by sulphide. *Biochemical Society Transactions*, 3(2), 316–319. <https://doi.org/10.1042/bst0030316>
- O’Kelly, T., Brading, A., & Mortensen, N. (1993). Nerve mediated relaxation of the human internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut*, 34(5), 689–693. <https://doi.org/10.1136/GUT.34.5.689>
- Olas, B. (2015). Hydrogen sulfide in signaling pathways. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 439, pp. 212–218). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.037>
- Olson, K. R., DeLeon, E. R., Gao, Y., Hurley, K., Sadauskas, V., Batz, C., & Stoy, G. F. (2013). Thiosulfate: A readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 305(6). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00421.2012>
- Olson, K. R., & Straub, K. D. (2016). The role of hydrogen sulfide in evolution and the evolution of hydrogen sulfide in metabolism and signaling. *Physiology*, 31(1), 60–72. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00024.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/PHY0011603120003.JPEG>
- Pandolfino, J. E., Zhang, Q. G., Ghosh, S. K., Han, A., Boniquit, C., & Kahrilas, P. J. (2006). Transient Lower Esophageal Sphincter Relaxations and Reflux: Mechanistic Analysis Using Concurrent Fluoroscopy and High-Resolution Manometry. *Gastroenterology*, 131(6), 1725–1733. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.09.009>
- Paolocci, N., Saavedra, W. F., Miranda, K. M., Martignani, C., Isoda, T., Hare, J. M., Espey, M. G., Fukuto, J. M., Feelisch, M., Wink, D. A., & Kass, D. A. (2001). Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10463–10468. <https://doi.org/10.1073/PNAS.181191198>
- Papasova, M. (1989). Sphincteric function. In *Handbook of Physiology, The Gastrointestinal System* (pp. 987–2023).
- Patel, P., Vathish, M., Heptinstall, J., Wang, R., & Carson, R. J. (2009). The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-10>
- Paterson, W. G., Anderson, M. A. B., & Anand, N. (1992). Pharmacological characterization of lower esophageal sphincter relaxation induced by swallowing, vagal efferent nerve stimulation, and esophageal distention. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 70(7), 1011–1015. <https://doi.org/10.1139/Y92-139>
- Paul, B. D., & Snyder, S. H. (2015). Modes of physiologic H₂S Signaling in the brain and peripheral tissues. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 22, Issue 5, pp. 411–423). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5917>
- Petrosino, M., Zuhra, K., Kopec, J., Hutchin, A., Szabo, C., & Majtan, T. (2022). H₂S biogenesis by cystathionine beta-synthase: mechanism of inhibition by aminooxyacetic acid and unexpected role of serine. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 79(8). <https://doi.org/10.1007/S00018-022-04479-9>
- Preiksaitis, H. G., Tremblay, L., & Diamant, N. E. (1994). Cholinergic responses in the cat lower esophageal sphincter show regional variation. *Gastroenterology*, 106(2), 381–388. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90596-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90596-7)
- Pushpakumar, S., Kundu, S., & Sen, U. (2014). Endothelial Dysfunction: The Link

- Between Homocysteine and Hydrogen Sulfide. *Current Medicinal Chemistry*, 21(32), 3662–3672. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140706142335>
- Quan, X., Luo, H., Liu, Y., Xia, H., Chen, W., & Tang, Q. (2015). Hydrogen sulfide regulates the colonic motility by inhibiting both L-type calcium channels and BKCa channels in smooth muscle cells of rat colon. *PLoS ONE*, 10(3), e0121331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121331>
- Que, J. (2015). The initial establishment and epithelial morphogenesis of the esophagus: a new model of tracheal-esophageal separation and transition of simple columnar into stratified squamous epithelium in the developing esophagus. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 4(4), 419–430. <https://doi.org/10.1002/WDEV.179>
- Radulovic, M., Anand, P., Korsten, M. A., & Gong, B. (2015). Targeting Ion Channels: An Important Therapeutic Implication in Gastrointestinal Dysmotility in Patients With Spinal Cord Injury. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 21(4), 494. <https://doi.org/10.5056/JNM15061>
- Rattan S. (1986). The non-adrenergic non-cholinergic innervation of the esophagus and the lower esophageal sphincter - PubMed. *H Int Pharmacodyn Ther.*, 280(2), 62–83. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2873802/>
- Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., & Roth, S. H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 32, pp. 109–134). Annu Rev Pharmacol Toxicol. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.32.040192.000545>
- Ren, J., Fang, X., Liu, P., Zhao, H. Y., Zhang, S. T., Han, P., Huang, H. X., & Wang, W. (2016). Role of BKCa in Stretch-Induced Relaxation of Colonic Smooth Muscle. *BioMed Research International*, 2016, 11. <https://doi.org/10.1155/2016/9497041>
- Richter, J. E., Wu, W. C., Johns, D. N., Blackwell, J. N., Nelson, J. L., Castell, J. A., & Castell, D. O. (1987). Esophageal manometry in 95 healthy adult volunteers - Variability of pressures with age and frequency of “abnormal” contractions. *Digestive Diseases and Sciences*, 32(6), 583–592. <https://doi.org/10.1007/BF01296157>
- Rishniw, M., Rodriguez, P., Que, J., Burke, Z. D., Tosh, D., Chen, H., & Chen, X. (2011). Molecular aspects of esophageal development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1232(1), 309–315. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2011.06071.X>
- Rizvi, S., Wehrle, C. J., & Mark A. Law. (2021). *Anatomy, Thorax, Mediastinum Superior and Great Vessels*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30137860/>
- RM, D., HK, P., JL, L., MA, K., G, C., R, G., & IM, W. (2015). Interactions of the gasotransmitters contribute to microvascular tone (dys)regulation in the preterm neonate. *PloS One*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0121621>
- Rogers, R. C., Hermann, G. E., & Travagli, R. A. (1999). Brainstem pathways responsible for oesophageal control of gastric motility and tone in the rat. *The Journal of Physiology*, 514(Pt 2), 369. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7793.1999.369AE.X>
- Rosen, R. D., & Winters, R. (2021). Physiology, Lower Esophageal Sphincter. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557452/>
- Ross MH, P. W. (2011). *Histology. A Text and Atlas. 6th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Rossiter, C. D., Norman, W. P., Jain, M., Hornby, P. J., Benjamin, S., & Gillis, R. A.

- (1990). Control of lower esophageal sphincter pressure by two sites in dorsal motor nucleus of the vagus. *The American Journal of Physiology*, 259(6 Pt 1). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1990.259.6.G899>
- Rothberg, B. S. (2012). The BK channel: a vital link between cellular calcium and electrical signaling. *Protein & Cell* 2012 3:12, 3(12), 883–892. <https://doi.org/10.1007/S13238-012-2076-8>
- Schicho, R., Krueger, D., Zeller, F., Von Weyhern, C. W. H., Frieling, T., Kimura, H., Ishii, I., De Giorgio, R., Campi, B., & Schemann, M. (2006). Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology*, 131(5), 1542–1552. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2006.08.035>
- Schmalz, F., Kinsella, J., Koh, S. D., Vogalis, F., Schneider, A., Flynn, E. R. M., Kenyon, J. L., & Horowitz, B. (1998). Molecular identification of a component of delayed rectifier current in gastrointestinal smooth muscles. *The American Journal of Physiology*, 274(5). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1998.274.5.G901>
- Shibuya, N., & Kimura, H. (2013). Production of hydrogen sulfide from D-cysteine and its therapeutic potential. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 4, Issue JUL). Front Endocrinol (Lausanne). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00087>
- Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., Ogasawara, Y., Fukui, K., Nagahara, N., & Kimura, H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2371>
- Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., & Nagahara, N. (2009). *Vascular Endothelium Expresses 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase and Produces Hydrogen Sulfide*. 146(5), 623–626. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp111>
- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., & Kimura, H. (2009). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(4), 703–714. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2253>
- Shields, T. W., Locicero, J., Ponn, R. ., & Rusch, V. W. (1994). . In *General thoracic surgery, 4th edition* (pp. 1935–1936). Lippincott Williams / Wilkins Philadelphia. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(97\)70114-9](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(97)70114-9)
- Sivarao, D. V., Mashimo, H. L., Thatte, H. S., & Goyal, R. K. (2001). Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS(-/-) and hypotensive in W/W(v) mutant mice. *Gastroenterology*, 121(1), 34–42. <https://doi.org/10.1053/GAST.2001.25541>
- Sojitra, B., Bulani, Y., Putcha, U. K., Kanwal, A., Gupta, P., Kuncha, M., & Banerjee, S. K. (2012). Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 360(1–2), 61–69. <https://doi.org/10.1007/S11010-011-1044-6>
- Stark, M. E., & Szurszewski, J. H. (1992). Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. In *Gastroenterology* (Vol. 103, Issue 6, pp. 1928–1949). Gastroenterology. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91454-C](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91454-C)
- Suarez, F., Furne, J., Springfield, J., & Levitt, M. (1997). Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 272(5 35-5). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.5.g1028>
- Szabo, C., Ransy, C., Módis, K., Andriamihaja, M., Murghes, B., Coletta, C., Olah, G., Yanagi, K., & Bouillaud, F. (2014). Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms.

- British Journal of Pharmacology*, 171(8), 2099–2122. <https://doi.org/10.1111/BPH.12369>
- Tan, B., Li, X., Yin, Y., Wu, Z., Liu, C., Tekwe, C. D., & Wu, G. (2012). Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17(6), 2237–2246. <https://doi.org/10.2741/4047>
- Teague, B., Asiedu, S., & Moore, P. K. (2002). The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *British Journal of Pharmacology*, 137(2), 139. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0704858>
- Tian, Z. Q., Liu, J. F., Wang, G. Y., Li, B. Q., Wang, F. S., Wang, Q. Z., Cao, F. M., & Zhang, Y. F. (2004). Responses of human clasp and sling fibers to neuromimetics. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(4), 440–447. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1746.2003.03307.X>
- Tonini, M., De Giorgio, R., De Ponti, F., Sternini, C., Spelta, V., Dionigi, P., Barbara, G., Stanghellini, V., & Corinaldesi, R. (2000). Role of nitric oxide- and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurones in human gastric fundus strip relaxations. *British Journal of Pharmacology*, 129(1), 12–20. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0702977>
- Tøttrup, A., Knudsen, M. A., & Gregersen, H. (1991). The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in relaxation of the opossum lower oesophageal sphincter. *British Journal of Pharmacology*, 104(1), 113–116. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1991.TB12393.X>
- Uc, A., Oh, S. T., Murray, J. A., Clark, E., & Conklin, J. L. (1999). Biphasic relaxation of the opossum lower esophageal sphincter: Roles of NO[•], VIP, and CGRP. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(3 40-3). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1999.277.3.G548/ASSET/IMAGES/LARGE/AGIJ30903005X.JPEG>
- Vorobets, V. S., Kovach, S. K., & Kolbasov, G. Y. (2002). Distribution of Ion Species and Formation of Ion Pairs in Concentrated Polysulfide Solutions in Photoelectrochemical Transducers. *Russian J. Appl. Chem*, 75, 229–234.
- Wallace, J. L., Dickey, M., McKnight, W., & Martin, G. R. (2007). Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *FASEB Journal*, 21(14), 4070–4076. <https://doi.org/10.1096/FJ.07-8669COM>
- Wang, P., Zhang, G., Wondimu, T., Ross, B., & Wang, R. (2011). Hydrogen sulfide and asthma. In *Experimental Physiology* (Vol. 96, Issue 9, pp. 847–852). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.057448>
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*, 16(13), 1792–1798. <https://doi.org/10.1096/FJ.02-0211HYP>
- Wang, R. (2003). The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5(4), 493–501. <https://doi.org/10.1089/152308603768295249>
- Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*, 92(2), 791–896. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2011>
- Wang, Y., Zhao, X., Jin, H., Wei, H., Li, W., Bu, D., Tang, X., Ren, Y., Tang, C., & Du, J. (2009). Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(2), 173–179. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179333>

- Webb, G. D., Lay, H. L., Oh, V. M. S., Soh, B. Y., Yoke, P. C., Ali, M. Y., El Oakley, R., Chuen, N. L., Poo, S. W., Caleb, M. G., Salto-Tellez, M., Bhatia, M., Chan, E. S. Y., Taylor, E. A., & Moore, P. K. (2008). Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(2), 876–882. <https://doi.org/10.1124/JPET.107.133538>
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., & Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 463–472. <https://doi.org/10.1124/PR.57.4.9>
- Whiteman, M., Le Trionnaire, S. L., Chopra, M., Fox, B., & Whatmore, J. (2011). Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 121(11), 459–488. <https://doi.org/10.1042/CS20110267>
- Whiteman, M., Li, L., Kostetski, I., Chu, S. H., Siau, J. L., Bhatia, M., & Moore, P. K. (2006). Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(1), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.154>
- Willis, C. L., Gibson, G. R., Holt, J., & Allison, C. (1999). Negative correlation between oral malodour and numbers and activities of sulphate-reducing bacteria in the human mouth. *Archives of Oral Biology*, 44(8), 665–670. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(99\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00056-4)
- Xu, Y., Du, H. P., Li, J., Xu, R., Wang, Y. L., You, S. J., Liu, H., Wang, F., Cao, Y. J., Liu, C. F., & Hu, L. F. (2014). Statins upregulate cystathionine γ -lyase transcription and H₂S generation via activating Akt signaling in macrophage. *Pharmacological Research*, 87, 18–25. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2014.06.006>
- Yamato, S., Saha, J. K., & Goyal, R. K. (1992). Role of nitric oxide in lower esophageal sphincter relaxation to swallowing. *Life Sciences*, 50(17), 1263–1272. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90326-K](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90326-K)
- Yan, H., Du, J., & Tang, C. (2004). The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.081>
- Yang, H., Hou, C., Xiao, W., & Qiu, Y. (2022). The role of mechanosensitive ion channels in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.904203>
- Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., & Wang, R. (2005). Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of Physiology*, 569(Pt2), 519–531. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2005.097642>
- Yong, Q. C., Hu, L. F., Wang, S., Huang, D., & Bian, J. S. (2010). Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl. *Cardiovascular Research*, 88(3), 482–491. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVQ248>
- You, X. J., Xu, C., Lu, J. Q., Zhu, X. Y., Gao, L., Cui, X. R., Li, Y., Gu, H., & Ni, X. (2011). Expression of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase in human pregnant myometrium and their roles in the control of uterine contractility. *PLoS One*, 6(8), e23788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023788>
- Yu, Y.-C., Guo, H.-S., Li, Y., Piao, L., L, L., & Li ZL & Xu WX. (2003). Role of

- calcium mobilization in sodium nitroprusside-induced increase of calcium-activated potassium currents in gastric antral circular myocytes of guinea pig. *Acta Pharmacol Sin*, 24, 819–825. <http://www.chinaphar.com/article/view/9147>
- Zentilin, P., Conio, M., Mele, M. R., Mansi, C., Pandolfo, N., Dulbecco, P., Gambaro, C., Tessieri, L., Iiritano, E., Bilardi, C., Biagini, R., Vigneri, S., & Savarino, V. (2002). Comparison of the main oesophageal pathophysiological characteristics between short- and long-segment Barrett's oesophagus. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16(5), 893–898. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01237.x>
- Zhang, G., Wang, P., Yang, G., Cao, Q., & Wang, R. (2013). The inhibitory role of hydrogen sulfide in airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. *American Journal of Pathology*, 182(4), 1188–1195. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.12.008>
- Zhang, L., Zhao, W., Zheng, Z., Wang, T., Zhao, C., Zhou, G., Jin, H., & Wang, B. (2016). Hydrogen sulfide synthesis enzymes reduced in lower esophageal sphincter of patients with achalasia. *Diseases of the Esophagus : Official Journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*, 29(7), 801–806. <https://doi.org/10.1111/DOTE.12385>
- Zhang, Y., & Paterson, W. G. (2003). Role of sarcoplasmic reticulum in control of membrane potential and nitroergic response in opossum lower esophageal sphincter. *British Journal of Pharmacology*, 140(6), 1097–1107. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0705537>
- Zhao, P., Huang, X., Wang, Z. yu, Qiu, Z. xun, Han, Y. fei, Lu, H. li, Kim, Y. chul, & Xu, W. xie. (2009). Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. *European Journal of Pharmacology*, 616(1–3), 223–228. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2009.05.014>
- Zhao, W., & Wang, R. (2002). H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 283(2). <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00013.2002>
- Zhao, Weimin, Ndisang, J. F., & Wang, R. (2003). Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 81(9), 848–853. <https://doi.org/10.1139/y03-077>
- Zhou, Z., Martin, E., Sharina, I., Esposito, I., Szabo, C., Bucci, M., Cirino, G., & Papapetropoulos, A. (2016). Regulation of soluble guanylyl cyclase redox state by hydrogen sulfide. *Pharmacological Research*, 111, 556–562. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2016.06.029>
- Zuhra, K., Augsburger, F., Majtan, T., & Szabo, C. (2020). Cystathionine-β-synthase: Molecular Regulation and Pharmacological Inhibition. *Biomolecules*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/BIOM10050697>