

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**KAVEOLA VE KAVEOLİNLERİN İZOLE İNSAN SAFEN
VENİNDE HİDROJEN SÜLFÜR (H₂S) İLE GÖZLENEN
GEVŞEME YANITLARINDAKİ ROLÜ**

SELİN YAMAKOĞLU

**DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. F. İLKAY ALP YILDIRIM**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

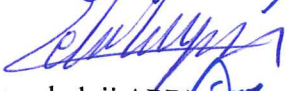
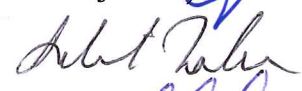
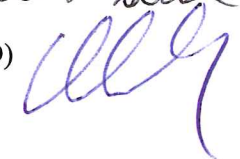
İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı Farmakoloji Programında Selin YAMAKOĞLU tarafından hazırlanan Kaveola ve kaveolinlerin izole insan safen veninde Hidrojen Sülfür ile gözlenen gevşeme yanıtlarındaki rolü başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

07 / 07 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN (İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD)	
2.Prof. Dr. Zeliha YAZICI (İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD)	
3.Doç. Dr. Günay YETİK ANACAK (Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD)	
4.Yard. Doç. Dr. Selçuk TAKIR (İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD)	
5.Yard. Doç. Dr. İlkay ALP YILDIRIM (İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD)	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Selin Yamakoğlu



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilimsel ve mesleki tecrübelerinden yararlandığım, manevi desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. B.Sönmez UYDEŞ DOĞAN’a,

Tez çalışmamın her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim süresince büyük bir sabır ve titizlikle bana yardımcı olan ve yol gösteren; bilgi ve tecrübelerini paylaşan, anlayış ve hoşgörüsüyle her konuda desteğini hissettiğim çok değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. F. İlkay ALP YILDIRIM’a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel tecrübelerinden yararlandığım ve yanlarında eğitim almaktan gurur duyduğum Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Gökçe TOPAL TANYILMAZ, Doç. Dr. Alper OKYAR, Yrd. Doç. Dr. Selçuk TAKIR, Yrd. Doç. Dr. Deniz KALELİ DURMAN, Arş.Gör. Dr. Zeliha PALA KARA ve Arş.Gör. Dr. Nihan ÇARÇAK’a,

Her türlü yardımları ve destekleri ile her zaman yanımda olan dostlarım ve değerli çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Narin ÖZTÜRK, Uzm.Ecz. Gülsev ÖZEN, Uzm. Ecz. Dilek ÖZTÜRK, Uzm.Ecz. İsmail Hakkı ALTUN, Ecz. Ayça TOPRAK, Ecz. Merve KABASAKAL, Ecz. Erkan CİVELEK, Ecz. Armond DACİ, Ayşe DOĞDU, Nesibe ŞİMŞEK’e ve Anabilim Dalı görevlimiz Erdal DOĞAN’a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni “Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu” ile destekleyen TÜBİTAK’a,

Tüm hayatım boyunca destek ve ilgileri ile hep yanımda olan, yüksek lisans eğitimim boyunca sabır ve anlayış gösteren, sıkıntılarımı paylaşan değerli AİLEME,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39306

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hidrojen Sülfür'ün Genel Özellikleri	4
2.2. Hidrojen Sülfür'ün Biyosentezi	5
2.3. Hidrojen Sülfür'ün Katabolizması.....	9
2.4. Hidrojen Sülfür'ün Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri.....	9
2.4.1. Hidrojen Sülfür'ün Vasküler Tonusun Regülasyonundaki Rolü	9
2.4.2. Hidrojen Sülfür'ün Kalp Üzerine Etkileri.....	15
2.5. Hidrojen Sülfür'ün Anjiogenez Üzerine Etkileri.....	15
2.6. Hidrojen Sülfür'ün Ateroskleroz Oluşumu Üzerine Etkileri	17
2.7. Hidrojen Sülfür'ün Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	19
2.8. Hidrojen Sülfür'ün Endokrin Sistem Üzerine Etkileri.....	20
2.9. Nitrik Oksit, Karbon Monoksit ve Hidrojen Sülfür İlişkisi	22
2.10. Lipid Raftlar.....	24
2.11. Kaveola	24
2.12. Kaveola ve Endotel Fonksiyonu	27
2.12.1. Kaveola ve eNOS İlişkisi.....	27
2.12.2. İntraselüler Kalsiyumun Düzenlenmesi ve EDHF Yolağı.....	29
2.12.3. Mekanotransdüksiyon	31
2.12.4. Makromoleküllerin Transportu	31

2.13. Kaveola ve Anjiogenez	32
2.14. Kaveola ve Ateroskleroz	33
2.15. Kaveola ve Miyokardiyal Fonksiyon	34
2.16. Siklodekstrinler ve Kaveola Deplesyonu	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Araç ve Gereçler	39
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları	39
3.3. İzole Safen Ven Preparatlarının Hazırlanması	40
3.4. Deney Protokolü	41
3.5. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	44
4.1. Hastaların Klinik Özellikleri	44
4.2. İzole İnsan Safen Venlerinin Endotel ve Düz Kas Gevşeme Cevaplarının İncelenmesi	44
4.2.1. Asetilkolinin Etkisi	44
4.2.2. Sodyum Nitroprussiyatın Etkisi	44
4.3. İzole İnsan Safen Ven Preparatlarında Hidrojen sülfür'ün (10^{-9} - 3×10^{-3}) Etkisi	46
4.4. Hidrojen sülfür'ün İzole İnsan Safen Venlerindeki Gevşetici Etkisine Aracılık Eden Mekanizmasının İncelenmesi	47
4.4.1. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörü L-NOARG'ın Etkisi	47
4.4.2. K_{ATP} Kanal İnhibitörü Glibenklamid'in Etkisi	48
4.4.3. K_v Kanal İnhibitörü 4-aminopiridin'in Etkisi	49
4.5. Kaveola Deplesyonu Yapılan İzole İnsan Safen Ven Preparatlarında Asetilkolin'in Etkisi	50
4.6. Kaveola Deplesyonu Yapılan İzole İnsan Safen Ven Preparatlarında Sodyum Nitroprussiyatın Etkisi	51
4.7. Kaveola Deplesyonu Yapılan İzole İnsan Safen Ven Preparatlarında Hidrojen Sülfür'ün Etkisi	52
4.8. Tablolar	53
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	64
ETİK KURUL KARARI	82
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Koroner Bypass Operasyonuna Giren Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri	53
Tablo 4-2: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen ven preparatlarında Ach, sodyum nitroprussiyat ve NaHS'in E_{maks} ve pD_2 değerleri.....	54
Tablo 4-3: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen ven preparatlarının L-NOARG (10^{-4} M, 20dk), glibenklamid (10^{-5} M, 20 dk) ve 4-aminopiridin (2×10^{-3} M, 20 dk) ile inkübasyonunun NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen E_{maks} ve pD_2 değerlerine etkisi.....	54
Tablo 4-4: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen ven preparatlarının M β CD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübasyonunun NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}), Ach (10^{-8} - 10^{-4}) ve SNP (10^{-8} - 10^{-4}) ile elde edilen E_{maks} ve pD_2 değerlerine etkisi.....	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: H ₂ S Biyosentezi (Martelli ve ark. 2012'den değiştirilerek).....	7
Şekil 2-2: Kaveola organizasyonu ve sinyalizasyon fonksiyonu (Berridge 2012'den değiştirilerek).....	26
Şekil 4-1: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerine kümülatif olarak Ach (10^{-8} - 10^{-4}) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrileri (n=22).	45
Şekil 4-2: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde kümülatif olarak SNP (10^{-8} - 10^{-4}) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrileri (n=22).....	45
Şekil 4-3: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılmış izole insan safen venlerine kümülatif olarak NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrileri (n=22).	46
Şekil 4-4: Kontrol ve NOS inhibitörü L-NOARG (10^{-4} M, 20 dk) ile inkübe edilen izole insan safen venlerinde NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=7). $p > 0.05$	47
Şekil 4-5: Kontrol ve K _{ATP} kanal inhibitörü Glibenklamid (10^{-5} M, 20 dk) ile inkübe edilen izole insan safen venlerinde NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=8).	48
Şekil 4-6: Kontrol ve K _v kanal inhibitörü 4-aminopiridin (2×10^{-3} M, 20 dk) ile inkübe edilen izole insan safen venlerinde NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=6). $p > 0.05$	49
Şekil 4-7: Kontrol ve M β CD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde Ach (10^{-8} - 10^{-4}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=5).	50
Şekil 4-8: Kontrol ve M β CD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde SNP (10^{-8} - 10^{-4}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=7). $p > 0.05$..	51
Şekil 4-9: Kontrol ve M β CD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=14)	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

4-AP= 4-aminopiridin

Ach= Asetilkolin

ANP= Atrial natriüretik peptid

Ca²⁺=Kalsiyum

CAT= Sistein amino transferaz

CBS= Sistasyonin beta sentaz

CO= Karbon monoksit

CSD= Kaveolin-1 scaffolding (iskele) domain

CSE= Sistasyonin gama liyaz

DAO= D-aminoasit oksidaz

EDHF= Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör

eNOS= Endotelyal nitrik oksit sentaz

GSH= Glutasyon

H₂S= Hidrojen sülfür

HDL= Yüksek dansiteli lipoprotein

HO-1= Hem oksijenaz-1

IK_{Ca}= Orta kondüktanslı kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı

iNOS= İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

K⁺= Potasyum

K_{ATP}= ATP-duyarlı potasyum kanalı

KCl= Potasyum klorür

K_v= Voltaj-duyarlı potasyum kanalı

LDL= Düşük dansiteli lipoprotein

L-NAME= L-nitro-arjinin metil ester

L-NOARG= N^G-nitro-L-Arginin

LTP= Long Term Potentiation (Uzun süreli potensiyalizasyon)

MPST= 3- merkaptopirüvat sülfürtransferaz

MβCD= Metil β-siklodekstrin

NA= Noradrenalin

NADH= Nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH= Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NaHS= Sodyum hidrojen-sülfür

NMDA= N-metil D-aspartat

nNOS= Nöronal nitrik oksit sentaz

NO= Nitrik oksit

NOS= Nitrik oksit sentaz

PAG= DL-Proparjilglisin

PLP= Piridoksal-5-fosfat

sAMP= Siklik adenozin monofosfat

sGC= Çözünür guanilat siklaz

sGMP= Siklik guanozin monofosfat

SK_{Ca} = Düşük kondüktanslı kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı

SNP= Sodyum nitroprusiyat

TRPA1= Geçici reseptör potansiyeli olan ankyrin 1

TRPC1= Geçici reseptör potansiyeli olan katyon 1

VEGF= Vasküler endotelyal büyüme faktörü

γ -GCS= γ -glutamil sistein sentetaz

ÖZET

Yamakoğlu, S. (2014). Kaveola ve Kaveolinlerin İzole İnsan Safen Veninde Hidrojen Sülfür (H_2S) İle Gözlenen Gevşeme Yanıtlarındaki Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

H_2S , karbonmonoksit (CO) ve nitrik oksit'ten (NO) sonra üçüncü gazotransmitter olarak kabul edilmekte, organizmada pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynamaktadır. H_2S 'in hayvan kaynaklı vasküler yapılardaki gevşetici etkisini ortaya koyan çalışmalar olmasına karşın, insan kaynaklı damar yataklarındaki etkisinin değerlendirildiği çalışmalar izole insan internal meme arteri ile yürütülen tek bir çalışma ile sınırlıdır. NO ve CO'nun sentezinden sorumlu olan enzimlerin kaveola adı verilen plazmalemmal membran invajinasyonlarında lokalize oldukları ve aktivitelerinin kaveolanın temel proteini kaveolin-1 ile negatif olarak düzenlendiği gösterilmiştir. Ancak kaveolanın yapısal bütünlüğünün H_2S ile indüklenen yanıtlar üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla, çalışmamızda bypass greft materyali olarak sıklıkla kullanılan izole insan safen veninde H_2S 'in konsantrasyon bağımlı etkilerinin, bu etkiye aracılık eden mekanizmaların ve kaveolar bütünlüğün öneminin araştırılması hedeflenmiştir. İzole insan safen venlerinde H_2S donörü NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3} M) noradrenalin ile önceden kastırılan dokularda konsantrasyon bağımlı gevşeme cevaplarına neden olmuştur. NaHS'nin safen venler üzerindeki gevşetici etkisi ve/veya dokuların NaHS'e duyarlılığı NOS inhibitörü ve K_{ATP} kanal inhibitörü varlığında azalmıştır. Metil β -siklodekstrin inkübasyonu (10^{-2} M, 1 saat) aracılığıyla kaveola deplesyonu yapılan dokularda asetilkolin ve NaHS ile indüklenen gevşeme cevaplarının anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bulgularımız, izole insan safen veninde H_2S 'in konsantrasyon bağımlı olarak gevşetici etki gösterdiğini ve söz konusu gevşetici etkiye NO ve K_{ATP} kanallarının aracılık ettiğini ortaya koymaktadır. Kaveola deplesyonu yapılmış izole insan safen venlerinde H_2S donörü NaHS'in gevşetici etkilerinin azalması, sinyal transdüksiyonunda önemli rol oynayan çeşitli proteinlerin ve iyon kanallarının (Örn. K_{ATP} kanalları) lokalize olduğu ve sinyal üretim merkezi olarak kabul edilen kaveolar yapının bütünlüğünün H_2S cevaplarında rolü olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Kaveola, kaveolin, hidrojen sülfür, safen ven, gevşeme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39306

ABSTRACT

Yamakoğlu, S. (2014). The role of caveolae and caveolins on the hydrogen sulfide (H_2S) induced relaxation in isolated human saphenous veins. Istanbul University, Institute of Health Science, Pharmacology Department. Master Thesis. İstanbul.

Hydrogen sulfide (H_2S), third gasotransmitter after nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO), plays important role in many physiological and pathological processes. Several studies revealed relaxant effects of H_2S on vascular beds of animals, but only one study was conducted on human vascular beds of isolated human internal mammary artery. Enzymes responsible for synthesis of NO and CO were localized in caveolae and activity of these enzymes were negatively regulated by caveolin-1. So far, effects of structural integrity of caveolae on H_2S induced responses has not been investigated. In this study, we aimed to investigate concentration-dependent effects of H_2S on isolated human saphenous veins, mechanisms mediating these effects and evaluate the importance of the integrity of caveolae. H_2S donor NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3} M) has caused concentration-dependent relaxation response in precontracted tissues. Relaxant effects of NaHS and/or sensitivity of tissues to NaHS were decreased in the presence of NOS inhibitor and K_{ATP} channel inhibitor. Acetylcholine and NaHS induced relaxation responses in tissues pretreated with methyl β -cyclodextrin (10^{-2} M, 1h) was significantly reduced. Our findings reveal that relaxant effect of H_2S is concentration-dependent in isolated human saphenous veins and mediated by NO and K_{ATP} channels. Since caveolar structure includes various proteins and ion channels (e.g. K_{ATP} channels) which play important roles in signal transduction and was accepted as signal production center, reduction in relaxant effects of H_2S donor NaHS in isolated human saphenous veins in which caveolae depletion was achieved, suggests crucial role of integrity of caveolar structure on responses induced with H_2S .

Key Words: Caveolae, caveolin-1, hydrogen sulfide, saphenous vein, relaxation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 39306

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hidrojen sülfür (H_2S) renksiz, yanıcı, uçucu ve karakteristik çürümüş yumurta kokusuna sahip suda çözünebilen bir gazdır. Uzun yıllar toksik bir gaz olduğu bilinen hidrojen sülfürün organizmada endojen olarak sentezlendiği, bir çok fizyolojik ve patolojik süreci etkilediği ortaya konmuştur (Abe ve Kimura 1996). H_2S , karbon monoksit (CO) ve nitrik oksit (NO)'ten sonra üçüncü gazotransmitter olarak kabul edilmektedir (Wang 2002). Memelilerde sistatyonin beta sentaz (CBS), sistatyonin gama liyaz (CSE), 3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz (MPST) ve sistein aminotransferaz (CAT) enzimleri aracılığıyla sentezlenen H_2S ; kardiyovasküler sistemin düzenlenmesinde (Hosoki ve ark. 1997; Elrod ve ark. 2007; Kiss ve ark. 2008; Webb ve ark. 2008), hücre proliferasyonu ve apoptozunda (Yang ve ark. 2004; Rinaldi ve ark. 2006; Pyriochou ve ark. 2007; Cai ve ark. 2007), glukoz metabolizmasında (Ali ve ark. 2007), nörotransmisyonunda (Abe ve Kimura 1996) ve inflamasyonda (Li ve ark. 2006; Hu ve ark. 2007) rol oynamaktadır. H_2S 'in vasküler sistem üzerindeki etkisinin türlere ve incelenen damar yatağına bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Kaveola, 60-80 nm çapında, organizmada pek çok hücre tipinde bulunan, primer olarak glikosipingolipidler, kolesterol ve integral membran proteini olan kaveolinlerden oluşmuş özelleşmiş plazma membran invajinasyonlarıdır. Kaveola ve kaveolanın temel proteini olan kaveolinler makromoleküllerin transitozu (hücreye geçişi), kolesterol transportu, sinyal transdüksiyonu gibi pek çok hücresel olayda önemli roller oynamaktadır. G-proteini kenetli reseptörler, IP3 duyarlı kalsiyum kanalları, plazma membran kalsiyum ATPaz pompası, non-reseptör kinazlardan olan src ailesinin üyeleri, protein kinaz C gibi sinyal transdüksiyonunda önemli rol oynayan çeşitli proteinlerin kaveolada yer aldığının gözlemlenmesi kaveolalara sinyal üretim merkezi özelliği kazandırmaktadır (Lisanti ve ark. 1994). Gazotransmitter olarak adlandırılan NO ve CO'nun sentezinden sorumlu olan sırasıyla eNOS (endotelial nitrik oksit sentaz) (Drab ve ark. 2001; Razani ve Lisanti 2001; Razani ve ark. 2001) ve HO-1 (hem oksijenaz-1) gibi enzimlerin (Jung ve ark. 2003; Kim ve ark. 2004) kaveolanın temel proteini olan

kaveolin-1 ile fiziksel olarak etkileştiği ve söz konusu enzimlerin aktivitesinin negatif olarak düzenlendiği gösterilmiştir.

Kaveolin-1 geni silinmiş hayvanlarda yürütülen çalışmalar, kaveolin-1 ile eNOS etkileşmesinin fonksiyonel olarak önemli olduğunu ortaya koymuştur. Kaveolin-1 geni silinmiş farelerden izole edilen aortaların vazokonstriktör ajanlara olan cevaplarında anlamlı bir azalma olduğu, buna karşılık endotel aracılıklı bir vazodilatatör olan asetilkolin cevaplarının anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir. Her iki etkinin de nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü L-NAME varlığında geriye döndüğü gözlenmiştir (Drab ve ark. 2001; Razani ve Lisanti 2001; Razani ve ark, 2001). Bu bulgular, kaveolin-1 ve kaveolanın endotel hücrelerde eNOS aktivitesini ve NO salınımını düzenlediğini göstermektedir.

eNOS'a benzer şekilde HO-1 enziminin de kaveolada yer aldığı ve kaveolanın temel proteini olan kaveolin-1 ile fiziksel olarak etkileştiği tespit edilmiştir (Jung ve ark. 2003; Kim ve ark. 2004). HO-1 enzim aktivitesi kaveolin-1 yokluğunda artmaktadır. Buna karşın kaveolin-1 ekspresyonundaki artış LPS ile indüklenen HO-1'in inhibisyonuna neden olmaktadır. Sonuç olarak, HO-1 ve kaveolin-1 direkt olarak etkileşmekte ve HO-1 aktivitesi kaveolin-1 ile inhibe edilmektedir (Taira ve ark. 2011).

NO ve CO gibi gazotransmitterlerin etkisinin kaveolanın temel proteini olan kaveolin-1 ile negatif olarak düzenlendiğinin gösterilmiş olmasına karşın, diğer bir gazotransmitter olan H₂S'in kaveolin-1 ile etkileşimine ilişkin bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Korpus kavernosum dokusunda H₂S donörü olan NaHS'in kaveolin-1 ekspresyonunu etkilemediği öne sürülmüştür (Meng ve ark. 2012). Ancak kaveolinin H₂S sentezinden sorumlu enzimlerin düzenlenmesi ve H₂S ile indüklenen cevaplar üzerindeki etkisi henüz araştırılmamıştır.

H₂S'in deney hayvanı kaynaklı çeşitli damar yataklarında gevşetici etki gösterdiği gözlenmiştir. Ancak insan kaynaklı damar yataklarında H₂S'in direkt

etkisinin değerlendirildiği çalışmalar izole insan internal meme arteri ile yürütülen tek bir çalışma ile sınırlıdır. Bu bağlamda, çalışmamızda öncelikle koroner bypass operasyonlarında sıklıkla kullanılan bir greft materyali olan izole insan safen ven yatağında H_2S 'in konsantrasyon bağımlı etkilerinin ve bu etkiye aracılık eden mekanizmaların aydınlatılması hedeflenmiştir. Ayrıca mevcut literatür verileri incelendiğinde, kaveolanın yapısal bütünlüğünün H_2S ile indüklenen yanıtlardaki rolünün değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu amaçla, çalışmamızda kaveolanın yapısal bütünlüğünün H_2S ile indüklenen yanıtlar üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi de hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hidrojen Sülfür'ün Genel Özellikleri

Hidrojen sülfür (H_2S) renksiz, yanıcı, uçucu, karakteristik çürük yumurta kokusuna sahip suda çözünebilen bir gazdır. Uzun yıllardır toksik bir gaz olduğu bilinen hidrojen sülfürün fizyolojik önemi, 1996 yılında Abe ve Kimura tarafından yeni bir nöromodülatör olarak adlandırılmasıyla ortaya konmuştur (Abe ve Kimura 1996). H_2S , karbonmonoksit (CO) ve nitrik oksit (NO)'ten sonra üçüncü gazotransmitter olarak kabul edilmektedir. Gazotransmitterler; biyolojik membranlardan kolayca difüze olabilen, endojen olarak üretilen, fizyolojik konsantrasyonlarında biyolojik yolları/fonksiyonları etkileyebilen, spesifik hedef moleküllerinin varlığı ile karakterize gazlardır (Wang 2002). CO ve NO'ya benzer olarak H_2S de çeşitli enzimler ile endojen olarak sentezlenmekte, organizmada bir çok fizyolojik ve patolojik süreci etkilemektedir. H_2S , suda ve plazmada çözünebilen bir zayıf asittir. Suda H^+ , HS^- (hidrosülfür) ve S^{2-} (sülfür) iyonlarına disosiyasyon olmaktadır (Reiffenstein ve ark. 1992). Fizyolojik ısı ve pH'da (7.4) toplam sülfürün yaklaşık % 14'ü H_2S , % 86'sı HS^- şeklinde bulunmaktadır. H_2S yüksek lipofilik yapısı nedeniyle hücre membranlarından serbestçe difüze olabilmektedir (Liu ve ark. 2012). Endojen olarak sentezlenen H_2S 'in hızlıca sülfat'a okside olduğu ya da proteinlere bağlanarak depolandığı bildirilmektedir (Ishigami ve ark. 2009).

H_2S 'in dokularda ve biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu belirlemek için araştırmacılar tarafından kullanılan en yaygın iki yöntem metilen mavisi ile ölçüm ve sülfür duyarlı elektrotlar ile ölçümdür. Metilen mavisi ile ölçüm metodunda, H_2S 'in bir metal ile asidifikasyonu ve boyar madde [N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD)] ile reaksiyonu sonucu oluşan metilen mavisi spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmektedir. Sülfür duyarlı elektrotların kullanıldığı çalışmalarda, H_2S konsantrasyonunun sıçan serumunda yaklaşık 46 μM (Zhao ve ark. 2001), insan serumunda ise 34 μM (Chen ve ark. 2005) düzeyinde olduğu öne sürülmüştür. Metilen mavisi ve sülfür duyarlı elektrotlar ile ölçüm yöntemlerinin proteinlere bağlı sülfürün

salınımına neden olması, metilen mavisi metodu ile serbest H_2S ile birlikte HS^- ve S^{2-} iyonlarının da ölçülmesi, söz konusu ölçüm yöntemlerinin H_2S 'in mutlak konsantrasyonunu ortaya koyması açısından eksik kalabileceğini düşündürmektedir (Liu ve ark. 2012). Bu bağlamda gaz kromatografisi yönteminin serbest H_2S konsantrasyonunu ölçmek için daha uygun bir yöntem olduğu düşünülmüştür. Gaz kromatografisi ile ölçüm yapılan çalışmalarda, fare beyin ve karaciğer homojenatlarında (Furne ve ark. 2008) ve fare plazmasında H_2S konsantrasyonunun 15 nM düzeyinde olduğu öne sürülmüştür (Levitt ve ark. 2011). Organ banyosu ve hücre kültürü çalışmalarında H_2S 'in 100 μM altındaki konsantrasyonlarının, H_2S 'in fizyolojik konsantrasyonları ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Furne ve ark. 2008).

Canlılarda bir çok fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde önemli rol oynayan gazotransmitterlerin yüksek konsantrasyonları toksik etkilere neden olabilmektedir. Havadaki H_2S 'in 50 ppm üzerindeki miktarları gözlerde ve solunum sisteminde iritasyona yol açarken, 500 ppm üzerindeki miktarları insanlarda bilinç kaybı ve ölüme yol açabilmektedir (Reiffenstein ve ark. 1992). H_2S intoksikasyonu, sitokrom c oksidaz enziminin güçlü ve reversibl inhibisyonuna bağlı olarak oksidatif fosforilasyonun bloke edilmesi ile ilişkilidir (Reiffenstein ve ark. 1992). Diğer bir gazotransmitter olan NO 'nun yüksek konsantrasyonları, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak başlıca kardiyovasküler sistem ve sinir sistemine zarar verirken (Calabrese ve ark. 2007); yüksek miktarlardaki CO , hemoglobinin oksijenle bağlanmasını engelleyerek ölüme neden olabilmektedir (Prockop ve Chichkova 2007).

2.2. Hidrojen Sülfür'ün Biyosentezi

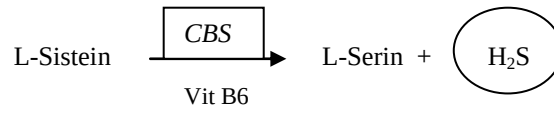
H_2S , memelilerde enzimatik ve nonenzimatik yollar aracılığıyla endojen olarak sentezlenebilmektedir. Sentezin nonenzimatik basamağını elementel sülfürün H_2S 'e indirgenmesi oluşturmaktadır. İndirgenme reaksiyonu için glukoz oksidasyonu ile oluşan indirgeyici ajanlar, $NADH$, $NADPH$ ve glutatyon (GSH) kullanılmaktadır. H_2S 'in nonenzimatik olarak sentezlenen miktarı enzimatik olarak sentezlenen miktarına kıyasla oldukça azdır.

Enzimatik senteze aracılık eden enzimler ise sistatyonin beta sentaz (CBS), sistatyonin gama liyaz (CSE), sistein amino transferaz (CAT) ve 3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz (MPST)'dir. CBS, CSE ve CAT piridoksal 5' fosfat (PLP) bağımlı enzimler iken, MPST çinkoya bağımlı bir enzimdir. CBS ve CSE sitozolde, CAT ve MPST ise hem mitokondri hem de sitozolde yer almaktadır. H₂S'in ana prekürsörü L-sistein'dir. Sisteine metabolize edilebilen L-metiyonin ise senteze aracılık eden diğer bir prekürsördür (Skovgaard ve ark. 2011). Shibuya ve arkadaşları tarafından yürütülen son çalışmalarda D-sistein'den D-amino asit oksidaz (DAO) enzimi aracılığıyla H₂S sentezlendiği gösterilmiştir (Shibuya ve ark. 2013). D-sistein'den H₂S sentezi pH 7.4'te optimum iken, L-sistein'den H₂S sentezi alkali koşullarda en yüksek seviyededir. Ayrıca D-sistein'den H₂S sentezi PLP'den bağımsız iken, L-sistein aracılı sentez PLP bağımlıdır (Shibuya ve Kimura 2013).

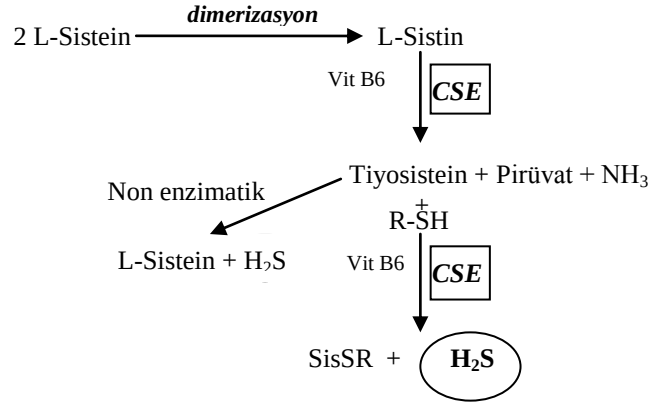
CBS ve CSE enzimlerinin karaciğer, böbrek, kalp, damar, beyin hücreleri ve lenfositler gibi pek çok hücrede eksprese olduğu belirlenmiştir. CBS ve CSE bazı dokularda H₂S'in lokal sentezine birlikte katkıda bulunurken (Örn; karaciğer ve böbrek), diğer dokularda bir enzimin etkisi daha baskındır. Kardiyovasküler sistemde H₂S sentezinde görevli ana enzim CSE iken, beyin ve sinir sisteminde baskın olan ana enzim CBS'dir. CSE başlıca vasküler ve vasküler olmayan düz kas hücrelerinde, karaciğerde ve endotel tabakasında; CBS ise karaciğer, böbrek, beyinde hipokampus ve beyincikte yüksek miktarda eksprese olmaktadır (Szabo 2007). CAT, MPST ile birlikte beyin ve vasküler endotel tabakasında H₂S üretimine katkıda bulunmaktadır. L-sistein yolağından farklı olarak, D-sistein'den H₂S sentezi başlıca beyincik ve böbreklerde gerçekleşmektedir. DAO beyincikte astrositlerde, Bergmann glia ve Purkinje hücrelerinde eksprese edilmekteyken, DAO ve MPST böbrekte CBS ve CSE'ye benzer şekilde proksimal tübüllerin korteksinde eksprese edilmektedir (Shibuya ve Kimura 2013).

Dokularda H₂S'in L-sistein'den enzimatik olarak sentezi dört farklı yolla gerçekleşebilmektedir (Şekil 2-1).

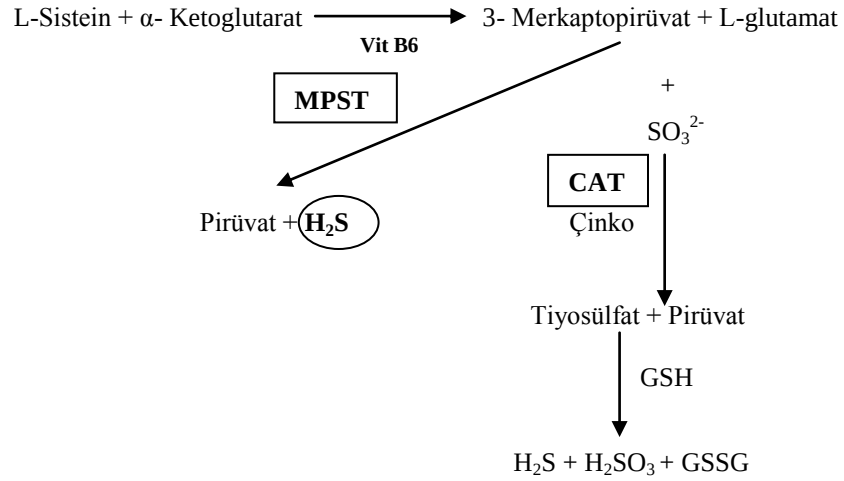
1. Yolak:



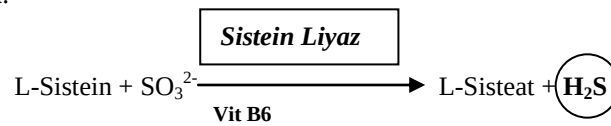
2. Yolak:



3. Yolak:



4. Yolak:



Şekil 2-1: H₂S Biyosentezi (Martelli ve ark. 2012'den değiştirilerek)

Birinci yolakta, L-Sistein'in CBS tarafından hidrolizi ile ekimolar miktarlarda H_2S ve L-serin oluşmaktadır.

İkinci yolakta, iki L-sistein molekülünün dimerizasyonu ile oluşan L-sistin CSE aracılı bir reaksiyon ile tiyosistein, pirüvat ve NH_3 'e parçalanmaktadır. Oluşan tiyosistein bu aşamadan sonra iki farklı yol izleyebilmektedir. Nonenzimatik olarak H_2S ve L-sistein oluşumuna neden olmaktadır, enzimatik olarak tiyol grubu içeren bir molekül (Örn; sistein veya glutatyon) ile CSE aracılı bir reaksiyonla etkileşerek H_2S oluşumuna neden olmaktadır.

Üçüncü yolakta, L-sistein ve α -ketoglutarat'tan CAT enzimi aracılığıyla 3-merkaptopirüvat ve L-glutamat oluşmaktadır. 3-merkaptopirüvat MPST enzimi ile desülfürasyona uğrayarak H_2S ve pirüvat oluştururken, sülfat (SO_3^{2-}) iyonları varlığında tiyosülfat ve pirüvat oluşturmaktadır. Oluşan tiyosülfat GSH ile etkileşerek H_2S , H_2SO_3 ve okside glutatyon (GSSG) oluşturmaktadır.

Dördüncü yolakta, L-sistein ve SO_3^{2-} sistein liyaz enzimi aracılığıyla H_2S ve L-sistet oluşturmaktadır .

CBS, CSE ve CAT enzim aktivitesi çeşitli endojen ve eksojen faktörler tarafından etkilenebilmektedir. Beyinde CBS enzim aktivitesi Ca^{2+} ve kalmodulin tarafından düzenlenmektedir. Hücre içi Ca^{+2} düzeyini arttıran faktörler [Örn; N-metil-D-aspartat (NMDA) ve AMPA reseptörlerini aktive eden glutamaterjik agonistler] CBS aracılı H_2S üretimini arttırmaktadır (Dominy ve Stipanuk. 2004). Normal şartlarda hücre içi düşük kararlı durum Ca^{+2} konsantrasyonlarında H_2S sentezinden sorumlu CSE ve 3MST/CAT enzimlerinin aktivitesinin, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarının artırılması ile azaldığı belirlenmiştir (Mikami ve ark. 2013). Ayrıca CBS enzim aktivitesinin NO ve CO tarafından inhibe edildiği (Puranik ve ark. 2006), CSE aracılı H_2S sentezinin ise NO donörleri varlığında arttığı bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2003).

2.3. Hidrojen Sülfür'ün Katabolizması

Endojen H_2S in vivo olarak farklı yollarla metabolize olabilmektedir. Mitokondride H_2S oksidasyonu ile oluşan tiyosülfat ($S_2O_3^{2-}$) sonrasında sülfat oksidaz enzimi vasıtasıyla sülfid (SO_3^{2-}) ve sülfat (SO_4^{2-})'a dönüşmektedir. Oksidasyonun gerçekleştiği ana organ karaciğer olmakla birlikte, vücuttaki tüm hücreler H_2S 'i oksitleyebilme kapasitesine sahiptir. Son ürün olan sülfatlar serbest veya konjuge sülfatlar halinde idrarla atılmaktadır. Diğer metabolik yolak sitozolde gerçekleşen metilasyondur. H_2S 'in sitozolik tiyol S-metiltransferaz (TSMT) enzimi aracılığıyla metilasyonu ile metantiyol (CH_3S) ve dimetilsülfür (CH_3SCH_3) oluşmaktadır. Bunların dışında H_2S kanda methemoglobin ile bağlanarak sulfhemoglobin oluşturabilmektedir. Vücutta yüksek miktarda H_2S oluşumuna neden olan septik şok, hemorajik şok ve pankreatit gibi durumlarda memeli akciğerlerinden de H_2S atılımı gerçekleşmektedir. Sağlıklı bireylerde akciğer yoluyla atılım idrarla atılıma göre oldukça düşük bir oranda gerçekleşir (Liu ve ark. 2012).

2.4. Hidrojen Sülfür'ün Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

2.4.1. Hidrojen Sülfür'ün Vasküler Tonusun Regülasyonundaki Rolü

H_2S 'in kalp ve kan damarları üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmaların sonuçları, H_2S 'in kardiyovasküler sistemde homeostazın sağlanmasında önemli bir rolü olduğunu işaret etmektedir. İlk olarak 1997 yılında Hosoki ve arkadaşları H_2S 'in noradrenalin ile önceden kastırılmış sıçan portal ven ve torasik aortasında konsantrasyon bağımlı bir gevşeme cevabına neden olduğunu göstermişlerdir (Hosoki ve ark. 1997). Takip eden çalışmalarda önceden kastırılmış sıçan mezenterik arter (Cheng ve ark. 2004), sıçan pulmoner arter (Wang ve ark. 2008), sıçan hepatik arter (Fiorucci ve ark. 2005), sıçan kuyruk arteri (Zhao ve ark. 2001) ve sıçan koroner arterinde (Cheang ve ark. 2010) de H_2S 'in konsantrasyon bağımlı gevşeme cevapları gözlenmiştir. Sıçan aortası, fare aortası ve insan internal mamaryal arteri gibi damar yataklarında yürütülen çalışmalarda H_2S 'in düşük konsantrasyonlarının (10-100 μM)

kasılma cevabı oluşturduğu, yüksek konsantrasyonlarının (100-1000 μM) ise aynı damar yataklarında gevşeme cevabına neden olduğu gözlenmiştir (Ali ve ark. 2006; Kubo ve ark. 2007a; Webb ve ark. 2008). H_2S 'in tavşan ve insan izole korpus kavernozumunda da gevşetici etki gösterdiği ve NO ile birlikte erektil fonksiyonun kontrolünde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Srilatha ve ark. 2007; Di Villa Bianca ve ark. 2009). Memeli olmayan omurgalılarda H_2S 'in vasküler etkileri daha kompleks olup, izole damarlarda gevşeme, kasılma veya çok fazlı cevaplar şeklinde farklılık göstermektedir (Dombkowski ve ark. 2005). Tatlı su kaplumbağalarına anestezi altında ve uyanık halde iken NaHS (H_2S donörü) enjeksiyonu yapılan in vivo bir çalışmada, NaHS'nin sistemik dolaşımında doz bağımlı bir kasılma cevabına neden olduğu bildirilmiştir (Stecyk ve ark. 2010).

Ali ve arkadaşlarının izole sıçan aortasında yürüttüğü çalışmalarda, NaHS'nin düşük konsantrasyonları (10-100 μM) fenilefrin ile önceden kastırılmış endoteli sağlam damarlarda kasılma cevabına neden olurken, endoteli tahrip edilmiş damarlarda herhangi bir kasılma cevabı gözlenmemiştir. Söz konusu çalışmada, NaHS'nin bazal tonusu etkilemediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada NaHS (50-200 μM), fenilefrin ile önceden kastırılmış sıçan aortasında asetilkolinle indüklenen gevşeme cevabını (endotel bağımlı) geriye döndürmüş, izoprenalin ile indüklenen gevşeme cevabını (endotelden bağımsız) ise etkilememiştir. Fenilefrin ile önceden kastırılmış aortalarda NO donörleri [sodyum nitroprussid (SNP), 3-morfolinosisidonimin (SIN-1), S-nitrozo-N-asetilpenisilamin (SNAP)] ve NaHS (100 μM) karışımı ile görülen gevşeme cevabı, sadece NO donörleri ile görülen gevşeme cevabına oranla azalmış bulunmuştur (Ali ve ark. 2006). Çalışma H_2S ile indüklenen kasılma cevabının endotel bağımlı olduğuna, H_2S 'in NO ile nitrozotiyol bileşiği oluşturarak NO'nun inaktivasyonuna neden olduğuna işaret etmektedir.

İzole sıçan ve fare aortasında yürütülen bir başka çalışmada, fenilefrin ile önceden kastırılmış sıçan aortasında ATP-duyarlı potasyum kanal (K_{ATP}) inhibitörü glibenklamid, NaHS'nin düşük dozları ile indüklenen kasılma cevabını arttırmış ve yüksek dozları ile görülen gevşeme cevabını kısmen inhibe etmiştir, glibenklamidin söz konusu etkisinin fare aortasında gözlenmediği belirtilmiştir. Potasyum klorür (KCl) ile önceden kastırılmış sıçan aortasında ise glibenklamid, NaHS ile gözlenen kasılma veya

gevşeme cevabında bir değişikliğe sebep olmamıştır. Aynı çalışmada NaHS (30-3000 μM)'nin, rekombinant endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini doza bağımlı olarak inhibe ettiği ve H_2S 'in eNOS enziminin direkt inhibisyonuna neden olarak NO'nun vazodilatatör etkisini baskılayabileceği bildirilmektedir (Kubo ve ark. 2007b).

Lim ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, sıçan aorta düz kas hücrelerinde adenilat siklaz aktivatörü forskolin ile indüklenen sAMP akümülyasyonunun, NaHS (5-100 μM) uygulaması ile anlamlı ölçüde inhibe olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda H_2S aracılı kasılma cevabının NO'dan bağımsız bir mekanizmayla sAMP düzeylerindeki azalmaya bağlı olarak da oluşabileceği bildirilmektedir (Lim ve ark. 2008). H_2S 'in vasküler etkisinin türlere, damar yatağına, endotel tabakasının durumuna, kastırıcı ajana, konsantrasyona, uygulama yöntemi ve süresine bağlı olarak değiştiği gözlenmektedir.

H_2S 'in etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yapılan ilk çalışmalarda H_2S 'in oluşturduğu gevşeme cevabına, ATP-duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) aracılık ettiği öne sürülmüştür (Zhao ve ark. 2001). K_{ATP} kanalları çeşitli dokuların sarkolemmal, mitokondriyal ve nükleer membranlarında yer alan ve iki farklı altbirimden oluşan içeriye doğru daha geçirgen düzeltici potasyum kanallarıdır. Por oluşturan proteinler (Kir6.1 ve Kir6.2) ve sulfonilüre reseptörleri (SUR) olarak bilinen düzenleyici proteinlerin farklı kombinasyonları K_{ATP} kanallarının farklı izoformlarını meydana getirmektedir. Kir6 proteinlerinin iki farklı alttipi (Kir6.1 ve Kir6.2) ve SUR üç alt tipi (SUR1, SUR2A, SUR2B) K_{ATP} kanallarının yapısına katılmaktadır. Kir6.1/SUR2B vasküler düz kas hücrelerinde, Kir6.2/SUR2B vasküler olmayan düz kas hücrelerinde ve Kir6.2/SUR2A kardiyak kanallarda yer almaktadır (Fujita ve Kurachi, 2000). Hücre içi ATP veya ADP düzeyi K_{ATP} kanal aktivasyonunu ya da inhibisyonunu etkileyen ana faktördür. Hücre içi yüksek ATP düzeyi K_{ATP} kanallarının kapanmasına yol açarken, ADP düzeyindeki artma ya da ATP/ADP oranındaki azalma kanalı aktive ederek hücre dışına potasyum iyon akışına neden olarak membran hiperpolarizasyonu oluşturmaktadır. K_{ATP} kanalları membran potansiyelinin kontrolünde, enerji metabolizması, apoptozis ve gen ekspresyonu gibi hücrel aktivitenin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Zhao ve arkadaşları ilk olarak bir K_{ATP} kanal açıcı olan Pinasidil'in H_2S ' in etkisini taklit ettiğini, K_{ATP} kanal inhibitörü olan glibenklamid'in ise H_2S ile görülen gevşeme cevabını bloke ettiğini ve yüksek ekstrasellüler K^+ a maruz bırakılan sıçan aortasında H_2S ' in etkisinin anlamlı bir şekilde azaldığını göstermiştir (Zhao ve ark. 2001). İzole sıçan aorta ve mezenterik düz kas hücrelerinde yapılan patch-clamp çalışmalarında ise H_2S ' in K_{ATP} kanalları aracılığı ile K^+ akımlarını arttırdığı ve düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona neden olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2001; Tang ve ark. 2005). Hiperpolarizasyon voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının kapanmasına, intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonunun azalmasına ve sonuç olarak dokuda gevşeme cevabının oluşmasına neden olmaktadır. H_2S ve K_{ATP} kanal proteinleri arasındaki etkileşimin incelendiği bir çalışmada, Kir6.1 ve SUR1 alt birimlerinin heterolog olarak eksprese edildiği HEK-293 hücrelerinde, H_2S 'in Kir6.1/SUR1 altbirimlerinin birlikte eksprese olduğu K_{ATP} kanallarını stimule ettiği, sadece Kir6.1 biriminin oluşturduğu K_{ATP} akımlarını ise etkilemediği görülmüştür. Çalışma H_2S ve K_{ATP} kanalı arasındaki etkileşimin SUR alt biriminin ekstrasellüler N-terminalinde gerçekleştiğini öne sürmektedir (Jiang ve ark. 2010). Aynı grubun en son çalışmasında H_2S 'in Kir6.1 birimindeki sistein-43 sülfhidrillediği, inhibitör olarak etki gösteren ATP'nin bağlanmasını azaltarak ve fosfatidilinositol-4,5-bifosfat'ın Kir6.1 e bağlanmasını artırarak K_{ATP} aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Mustafa ve ark. 2011).

Güçlü bir vazodilatör olan NO endotel tabakasında üretilmektedir. İlk olarak Hosoki ve arkadaşları H_2S ve NO arasındaki sinerjik etkiye dikkat çekerek NaHS'nin NO donörleri (Sodyum nitroprusiyat, 10 nM; 3-morfolinosidnonimin, 30 nM) varlığında anlamlı olarak daha güçlü bir gevşeme cevabı meydana getirdiğini bildirmiştir (Hosoki ve ark. 1997). H_2S ' in etkisinin endotel tabakası ile ilişkilendirildiği çalışmalarda, endotel tabakasının mekanik olarak uzaklaştırılmasının veya eNOS'un L-NAME (L-nitro-arjinin-metilester) ile inhibisyonunun H_2S ' in izole damarlardaki etkisinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Zhao ve ark. 2001). Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) ve NO salınımına aracılık eden düşük kondüktanslı Ca^{2+} ile aktive olan potasyum kanallarının apamin ve karibdotoksin kombinasyonu ile inhibisyonunun, H_2S ile görülen gevşeme cevabını azalttığı belirlenmiştir (Zhao ve ark. 2001; Cheng ve ark. 2004). Söz konusu sonuçlar, H_2S ile gözlenen gevşeme

cevaplarının kısmen endotel bağımlı ve NO ve/veya EDHF salınımı aracılı olduğunu göstermektedir.

İntraselüler pH değeri vasküler tonüsün düzenlenmesinde etkili bir faktördür. Vasküler düz kas hücrelerinde pH değerinin değişmesi hücre içi Ca^{+2} düzeyini değiştirmektedir. Vasküler dokuların çoğunda alkalizasyon kasılma cevabına yol açarken, asidifikasyon gevşeme cevabına neden olmaktadır. Lee ve arkadaşları H_2S 'in Cl/HCO^{3-} pompasını aktive ederek intraselüler asidoz oluşturabileceğini bildirmiştir (Lee ve ark. 2007). Söz konusu çalışmada intraselüler asidozun K_{ATP} kanallarını aktive ederek vazodilatasyona yol açabileceği ve H_2S aracılı gevşeme cevabında bu yolağın da etkili olabileceği öne sürülmüştür.

İzole sıçan koroner arterlerinde yürütülen bir çalışmada H_2S ' in gevşetici etkisinin voltaj-duyarlı potasyum kanalları (K_v) aracılığıyla oluştuğu bildirilmiştir (Cheang ve ark. 2010). Sıçan ve farelerin izole mezenterik arter ve aortalarında yürütülen bir başka çalışmada ise, H_2S 'in perivasküler adipoz dokudan salınan bir adiposit kaynaklı gevşetici faktör olabileceği ve etkisini K_v kanallarının bir tipi olan KCNQ kanalları üzerinden gösterdiği belirtilmiştir (Schleifenbaum ve ark. 2010).

Siklik guanozin monofosfat (sGMP)/PKG, miyozin hafif zincir defosforilasyonuna neden olarak dokuda gevşeme cevabı oluşturmaktadır. Bucci ve arkadaşlarının izole sıçan aortasında yürüttükleri çalışmalarda, aorta düz kas hücrelerinin NaHS (10-200 μM) ile inkübasyonunun ya da CSE overekspresyonunun (CSE cDNA transfeksiyonu) sGMP düzeylerini arttırdığı, CSE gen susturulmasının ise (siRNA modeli) sGMP düzeylerini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca H_2S 'in sGMP düzeylerini arttırıcı etkisinin, nonselektif bir fosfodiesteraz inhibitörü olan 3-izobutil-1-metilksantin varlığında anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir. Söz konusu çalışma H_2S 'in fosfodiesteraz aktivitesini inhibe ederek sGMP düzeylerini yükselttiğini öne sürmektedir (Bucci ve ark. 2010).

Kalsiyumsuz banyo ortamı ve ya Ca^{+2} kanal blokörü Nifedipin varlığında sıçan aortasında H_2S ile görülen gevşeme cevabının azaldığı gözlenmiştir (Zhao ve Wang 2002). Bu durum H_2S 'in etkisinin kısmen Ca^{+2} influsu (içe alım) ile ilişkili

olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde insan safen ven endotel hücrelerinde NaHS'nin hücre içi Ca^{+2} düzeyini anlamlı bir şekilde arttırdığı, söz konusu artışın intraselüler kaynaklardan sağlandığı ve H_2S 'in farklı mekanizmalarla endotel hücre içi kalsiyum düzeyini regüle ettiği bildirilmiştir (Bauer ve ark. 2010).

Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon meydana getirerek vazodilatasyona neden olmaktadır. Bu etki özellikle küçük rezistans arterlerde daha belirgindir. Yapılan son çalışmalar, H_2S 'in majör bir EDHF olduğunu öne sürmektedir (Mustafa ve ark. 2011). Mustafa ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada, H_2S 'in gevşetici etkisinde endotelial düşük kondüktanslı (SK_{Ca}) ve orta kondüktanslı kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının (IK_{Ca}) da etkili olduğu, karibdotoksin (IK_{Ca} blokörü) ve apamin (SK_{Ca} blokörü) kombinasyonu ile inkübasyonun fare aortası endotel hücrelerinde hiperpolarizasyonu azalttığı gösterilmiştir (Mustafa ve ark. 2011).

H_2S 'in sıçan mezenterik arterlerinde yüksek kondüktanslı kalsiyum ile aktive edilen potasyum kanalları (BK_{Ca}) aracılığıyla vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon ve vazodilatasyona yol açtığı gösterilmiştir (Jackson-Weaver ve ark. 2011). İntraselüler bir organel olan sarkoplazmik retikulumdan ryanodin reseptörü (RyR) aracılığıyla Ca^{+2} salınımına kalsiyum saçılması ya da kıvılcımı (spark) adı verilmektedir. Kalsiyum saçılması, vasküler düz kas hücrelerinde BK_{Ca} kanallarını aktive ederek membran hiperpolarizasyonuna ve vazodilatasyona neden olmaktadır. Jackson-Weaver ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında, sıçan mezenterik arterlerinde H_2S bağımlı gevşeme cevaplarının endotelial BK_{Ca} kanalları aktivasyonu ve düz kas kalsiyum saçılımının aktivasyonu ile gerçekleştiğini göstermiştir (Jackson-Weaver ve ark. 2013). Sıçan torasik aortasında yapılan bir diğer çalışmada, H_2S donörü NaHS'nin vazodilatör etkisinde K_{ATP} kanalları haricinde K_v7 (özellikle $K_v7.4$ alttipi) kanallarının da önemli bir rol üstlendiği öne sürülmüştür (Martelli ve ark. 2013).

2.4.2. Hidrojen Sülfür'ün Kalp Üzerine Etkileri

H_2S kalp dokusunda endojen olarak üretilmekte ve kardiyak fonksiyonların düzenlenmesinde rol almaktadır. NaHS, kalpte konsantrasyon bağımlı negatif inotropik etki göstermekte ve bu etki K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid ile kısmen ortadan kalkmaktadır (Geng ve ark. 2004). İrreversibl iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruma sağlayan ve özellikle iskemik önkoşullamada rol oynayan esas mekanizma miyokardda yer alan K_{ATP} kanallarının açılmasıdır. İzole perfüze sıçan kalbinde yapılan bir çalışmada NaHS, sol koroner arter ligasyonu ile indüklenen infarkt alanını konsantrasyon bağımlı bir şekilde azaltmıştır. Bu koruyucu etki K_{ATP} kanal blokörleri olan glibenklamid ve 5-hidroksidekanoat uygulaması ile geriye dönmüştür (Johansen ve ark. 2006). H_2S 'in kardiyoprotektif etkisinde ERK (ekstraselüler sinyal regüle kinaz) ve Akt yolağı (Hu ve ark. 2008) ile birlikte mitokondri yapı ve fonksiyonunun korunmasının da etkili olduğu bilinmektedir (Elrod ve ark. 2007). İskemik sonradan koşullanma reperfüzyonun erken döneminde H_2S biyosentezinde anlamlı bir stimülasyona yol açmaktadır. İskemi-reperfüzyon epizodlarına tabi tutulan sıçan kalbinde reperfüzyon periyodu esnasında NaHS uygulaması kalpte iskemi sonrası fonksiyonel performansı arttırmıştır (Yong ve ark. 2008).

H_2S 'in kalp hastalıklarındaki koruyucu rolü ani kardiyak arrest (CA) ve kardiyopulmoner resüsitasyon (CPR) oluşturulan fare modellerinde araştırılmıştır. CPR'dan 1 dakika önce H_2S donörü Na_2S (sodyum sülfür) 24 saatlik sağkalım oranını arttırmış, CA/CPR ile indüklenen oksidatif stresi önlemiş ve sol ventriküler disfonksiyonunu iyileştirmiştir. CPR'dan 10 dakika sonra uygulanan Na_2S 'in ise koruyucu etki göstermediği bildirilmiştir (Minamishima ve ark. 2009).

2.5. Hidrojen Sülfür'ün Anjiogenez Üzerine Etkileri

Anjiogenez varolan damar yataklarından yeni kan damarlarının oluştuğu kompleks bir fizyolojik süreçtir. Anjiyogenez, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), tümör nekroz faktör alfa ($TNF\alpha$) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi

anjyogenik faktörlerin endotel hücrelerini aktive etmek üzere çevre dokudan salınımı ile başlar. Proteolitik yıkılma, endotel hücrelerinin anjiogenik uyarı sonrası değişime uğraması ve göçünden sonra, endotel hücreleri birbirine yapışarak yeni damar boşluğunu oluştururlar. Son basamak olarak yapı içine tüp yapısı filizlenir ve kan akımı yeni oluşan yapı içinde dolaşıma başlar. Anjiogenezin her basamağı, proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki denge ile kontrol edilir. Erişkinlerde, anjiyogenez normalde yara iyileşmesi, doku tamiri ve menstrual siklus gibi birçok fizyolojik süreçte aktif hale geçer. Proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki denge proanjiogenik faktörler lehine bozulduğunda ise patolojik anjiogenezden söz edilebilir. Patolojik anjiogenez başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları, retinopatiler ve psöriyazis gibi hastalıklarda meydana gelmektedir (Carmeliet 2000).

RF/6A endotel hücre (Cai ve ark. 2007) ve insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) (Papapetropoulos ve ark. 2009) kültürlerinde yürütülen *in vitro* çalışmalarda, H_2S 'in endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu stimüle ettiği gözlenmiştir. Endotel hücre adhezyonunun sadece NaHS'nin düşük konsantrasyonlarında (10 ve 20 μM) görülmesi, 50 μM üzerinde görülmemesi H_2S 'in düşük konsantrasyonlarında proanjiogenik etkili olduğunu düşündürmektedir (Cai ve ark. 2007). Ayrıca söz konusu çalışmada *in vivo* matrigel modeli kullanılarak farelere intraperitoneal yoldan NaHS (10–200 $\mu mol/kg/gün$, 7 gün boyunca) uygulanmış ve NaHS (10 ve 50 $\mu mol/kg/gün$) uygulamasının matrigelde neovaskülarizasyonu, hücresel infiltrasyonu ve hemoglobin içeriğini arttırdığı gözlenmiştir. Bu etki NaHS'nin yüksek dozlarında (200 $\mu mol/kg/gün$) gözlenmemiştir (Cai ve ark. 2007). Cıvciv koryoallantoik membran modelinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise, H_2S uygulamasının kan damarlarının gelişimini ve dallanmasını stimüle ettiği belirlenmiştir (Papapetropoulos ve ark. 2009). H_2S 'in anjiogenik etkisinde PI3K/Akt yolağının, mitojenle etkileşen protein kinaz yolağının (MAPK) ve K_{ATP} kanallarının etkili olduğu düşünülmektedir (Cai ve ark. 2007; Papapetropoulos ve ark. 2009).

İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücrelerinin VEGF ile stimülasyonunun H_2S salınımını arttırdığı, bu hücrelerde H_2S üretiminin ve K_{ATP} kanallarının farmakolojik

inhibisyonunun veya CSE geninin baskılanmasının VEGF aracılı sinyalizasyonu ve endotel hücre migrasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar VEGF ile indüklenen anjiogeneizde endojen H_2S 'in önemli bir mediyatör olduğunu işaret etmektedir (Papapetropoulos ve ark. 2009).

Papapetropoulos ve arkadaşları, sıçanlarda oluşturulan bir deri yanığı modelinde H_2S içeren fizyolojik solüsyonun topikal uygulamasının yara iyileşmesi sürecini anlamlı düzeyde olumlu yönde etkilediğini gözlemlemiştir. Buna paralel olarak CSE^{-/-} farelerde yara iyileşmesinin yabanıl farelere oranla anlamlı olarak gecikmesi, H_2S 'in yara iyileşme sürecindeki katkısını destekler niteliktedir (Papapetropoulos ve ark. 2009).

Anjiogenezin önemli rol oynadığı bir başka durum gastrik ülserlerin iyileşme sürecidir (Tarnawski 2005). Wallace ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada, anestezi altındaki sıçanların midelerinin serozal yüzeyine 1 dakika boyunca uygulanan asetik asit (%80, h/h) ile gastrik ülser modeli oluşturulmuş ve ülser indüksiyonundan sonra sıçanlara 10 gün boyunca intragastrik yoldan H_2S donörleri [Lawesson ajanı (10-30 μ mol/kg) ve 4-hidroksitiyobenzamid (10-30 μ mol/kg)] veya kontrol çözelti (%0,5 karboksimetilselüloz, 1 ml/kg) uygulanmıştır. 10 gün sonunda sıçanlardan izole edilen gastrik dokularda CSE, CBS enzim ekspresyonlarının ve H_2S üretiminin arttığı, H_2S donörlerinin gastrik iyileşme sürecini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir. İyileşme sürecinde endojen H_2S üretiminde görülen artış, endojen H_2S 'in yara iyileşmesini hızlandıran bir mekanizmada görev aldığını düşündürmektedir (Wallace ve ark. 2007).

2.6. Hidrojen Sülfür'ün Ateroskleroz Oluşumu Üzerine Etkileri

Ateroskleroz genellikle büyük ve orta çaplı arterlerde meydana gelen arter duvarında lipid birikimi ve plak oluşumu nedeniyle duvarda kalınlaşma ile karakterize kronik ve kompleks bir durumdur. Aterosklerotik plak oluşumunda vasküler inflamasyon, endotel hasarı, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu, makrofaj ve köpük hücre akümüasyonu ve lipid birikimi gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır. Ateroskleroz nedeniyle damarda görülen sertleşme ve lümendeki daralma kan akışını

engelleyerek plak trombojenitesini arttırmaktadır (Galkina ve Ley 2009). Yapılan son çalışmalar H_2S 'in endotel hücreleri üzerinde proliferatif etki göstererek anjiogenezi arttırdığı, düz kas hücrelerinde ise apoptozu indükleyerek ateroskleroza karşı koruduğunu göstermektedir (Yang ve ark. 2004; Yang ve ark. 2006).

CSE/ H_2S yolağının kardiyovasküler hastalıklar için pleotropik etkiler gösteren bir yolak olduğu düşünülmektedir. Sıçan karotid arterlerinde balon hasarı ile indüklenen neointimal hiperplazide H_2S 'in etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hasara uğratılan arterlerde CSE ekspresyon ve aktivitesinin ve H_2S düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Sıçanlara intraperitoneal yoldan NaHS uygulanmasının ($30 \mu\text{mol/kg/gün}$, 4 hafta boyunca) balon hasarı ile indüklenen neointimal lezyon oluşumunu azalttığını bildirilmiştir (Meng ve ark. 2007).

Apolipoprotein E geni silinmiş ($ApoE^{-/-}$) farelerde yürütülen bir çalışmada, söz konusu farelerde yabanıl farelere kıyasla plazma H_2S düzeyinin ve aortada H_2S üretiminin azaldığı, öte yandan plazma intraselüler adhezyon molekül-1 (ICAM-1) düzeylerinin, ICAM-1 protein ve mRNA düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Söz konusu çalışmada $ApoE^{-/-}$ farelere 10 hafta boyunca intraperitoneal yoldan uygulanan NaHS ($56 \mu\text{mol/kg/gün}$) ile plazma H_2S düzeylerinin arttığı, aterosklerotik plak boyutu, plazma ve aortik ICAM-1 düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir (Wang ve ark. 2009). Bu çalışma, H_2S 'in $ApoE^{-/-}$ farelerde antiaterojenik etkili olduğunu ve ICAM-1 ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermektedir.

CSE geni silinmiş farelerde yürütülen bir başka çalışmada, fareler 12 hafta süre ile aterojenik diyet veya normal diyet ile beslenmişler ve bu süre sonunda gruplar plazma lipid ve homosistein düzeyleri, oksidatif stres, aorta aterosklerotik lezyon boyutları, hücre proliferasyonu ve adhezyon molekül ekspresyonları açısından değerlendirilmiştir. Aterojenik diyet ile beslenen CSE geni silinmiş farelerde erken dönemde aortada yağlı çizgiler (fatty streak lesions) geliştiği, plazma kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinin, oksidatif stres ve adhezyon molekül ekspresyonunun arttığı ve hiperhomosisteinemi geliştiği görülmüştür. CSE geni silinmiş farelere intraperitoneal yoldan NaHS ($39 \mu\text{mol/kg/gün}$, 12 hafta boyunca) uygulaması hızlanmış ateroskleroz oluşumunu inhibe etmiştir. Söz konusu çalışmada, endojen olarak sentezlenen H_2S 'in

vasküler intimal proliferasyonu azaltmak ve adhezyon molekül ekspresyonunu inhibe etmek suretiyle vasküler dokuları aterosjenik hasara karşı koruduğu öne sürülmüştür (Mani ve ark. 2013).

Aterogeneizde, kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin kandaki inflamatuvar komponentler ve arter duvarındaki hücresel komponentler arasında iletişimi sağlayarak lökosit influks, efluks ve aktivasyonunda ayrıca plak hücrelerinin proliferasyon ve/veya apoptozunda düzenleyici rol oynadıkları bilinmektedir. Bu doğrultuda, H₂S'in kemokin ve kemokin reseptörleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen ApoE^{-/-} farelere NaHS (1 mg/kg/gün) veya bir CSE inhibitörü olan DL-propargilglisin (PAG, 10 mg/kg/gün) intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. NaHS uygulanan farelerde aortada CX3CR1 (kemokin reseptörü) ve CX3CL1 (kemokin) ekspresyonunun anlamlı olarak baskılandığı ve aortada plak gelişiminin engellendiği gözlenmiştir. PAG uygulanan farelerde ise H₂S oluşumunun inhibisyonu aortada CX3CR1 ve CX3CL1 ekspresyonunda artışa neden olmuş ve ateroskleroza şiddetlendirmiştir (Zhang ve ark. 2012).

2.7. Hidrojen Sülfür'ün Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Uzun yıllar toksik bir gaz olduğu bilinen H₂S'in fizyolojik önemi, 1996 yılında Abe ve Kimura tarafından yeni bir nöromodülatör olarak adlandırılmasıyla ortaya konmuştur (Abe ve Kimura 1996). H₂S'in nöromodülatör etkisini nöronlarda N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonunu arttırarak hipokampusun uzun süreli potansiyalizasyonunun (Long Term Potentiation, LTP) indüklenmesini kolaylaştırmak yoluyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Abe ve Kimura 1996). NMDA reseptörlerindeki aktivasyonunun etki mekanizmasında H₂S'in reseptördeki sistein disülfid bağını indirgemesi ve ardından beyinde H₂S oksidasyonu ile oluşan polisülfitlerin reseptörün sistein rezidülerinde sülfan sülfür bağı oluşturması rol oynamaktadır. Polisülfitler ayrıca astrositlerde TRPA1 (Geçici reseptör potansiyeli olan ankyrin 1) kanallarını aktive etmek suretiyle hücre içi Ca⁺² düzeylerini arttırmakta ve bu yolla astrositlerden NMDA reseptör aktivitesini arttıran D-serin salınımına neden olmaktadır (Kimura 2013).

H₂S aynı zamanda nöronları oksidatif strese karşı koruyan bir nöroprotektandır. Oksidatif stres majör bir intraselüler antioksidan olan glutatyonun (GSH) konsantrasyonlarında azalmaya neden olmaktadır. H₂S, sistin/glutamat antiporter ve sistein transporter aktivitesini arttırarak, glutatyon substratı olan sisteinin intraselüler konsantrasyonlarını arttırmakta ve bu yolla glutatyon üretimini arttırmaktadır. Ayrıca glutatyon sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan γ -glutamil sistein sentetaz (γ -GCS) enziminin aktivitesini arttırdığı da bildirilmiştir (Kimura 2013). Reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olan ana organel mitokondridir. Mitokondride 3MST/CAT yolağı aracılığıyla sentezlenen H₂S, reaktif oksijen türevlerini süpüren bir antioksidan olarak görev yapmaktadır (Kimura ve ark. 2010).

Retina yüksek miktarda oksijene ve ışığa maruz kalması nedeniyle oksidatif strese karşı daha hassastır. Aşırı miktarda ışığa maruziyet reaktif oksijen türevlerini ve intraselüler Ca⁺² konsantrasyonunu arttırarak fotoreseptörlerde irreversibl bir dejenerasyona neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, H₂S'in intraselüler Ca⁺² artışını baskılamak suretiyle fotoreseptör hücrelerini ışıkla indüklenen dejenerasyona karşı koruduğu gösterilmiştir (Mikami 2011)

2.8. Hidrojen Sülfür'ün Endokrin Sistem Üzerine Etkileri

Pankreatik β -hücreleri, glukozla uyarılan insülin salınımını gerçekleştirmek üzere özelleşmiş hücrelerdir. Pankreatik β -hücrelerine alınan glukoz glikolize uğrayarak hücre içinde adenin nükleotid (ATP) konsantrasyonunu yükseltmekte ve ATP konsantrasyonundaki bu artış hücre membranında lokalize K_{ATP} kanallarının kapanmasına neden olmaktadır. Kanalin kapanması, membranın depolarizasyonuna, voltaj-bağımlı kalsiyum (Ca⁺²) kanallarının açılmasına, hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun artmasına ve bu yolla hücre dışına insülin salınımına neden olmaktadır.

CBS ve CSE enzimlerinin pankreasta yüksek miktarda bulunması H₂S'in insülin sekresyonunun kontrolünde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Zucker diabetik şişman (ZDF), Zucker şişman (ZF) ve Zucker zayıf (ZL) sıçanlarda yapılan bir

araştırmada, pankreatik CSE enzim ekspresyonu ve H₂S üretiminin ZDF sıçanlarda ZF ve ZL sıçanlara oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sonucu olarak ZDF sıçanlarda serum insülin düzeylerinde azalma, hiperglisemi ve insülin direnci gelişmektedir. ZDF sıçanlara dört hafta boyunca intraperitoneal yoldan CSE inhibitörü PAG uygulaması, pankreatik H₂S üretimini inhibe ederek serum insülin düzeylerinin artmasına, hipergliseminin ve HbA1c düzeyinin azalmasına neden olmuştur. Aynı çalışmada H₂S'in izole sıçan pankreatik β -hücrelerinde K_{ATP} kanal aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırdığının görülmesi ile, ZDF sıçanlarda görülen bozulmuş insülin salınımı, pankreastaki H₂S üretiminin normalden çok daha yüksek miktarda olması ile ilişkilendirmiştir (Wu ve ark. 2009).

Yapılan diğer araştırmalarda, CSE inhibitörü PAG uygulamasının sıçan insülinoma hücrelerinde (INS-1E) insülin salınımını arttırdığı (Yang ve ark. 2005), H₂S'in eksojen olarak uygulanmasının ise INS-1E hücrelerinde (Yang ve ark. 2005) ve izole fare pankreas adacıklarında (Kaneko ve ark. 2006) glukozla indüklenen insülin salınımını azalttığı gözlenmiştir.

H₂S ile insülin salınımının düzenlenmesinde kritik rol oynayan bir diğer kanal olan L-tipi voltaj duyarlı Ca⁺² kanallarının rolünün araştırıldığı bir çalışmada, H₂S donörleri olan NaHS ve ACS67'nin fare pankreatik β -hücrelerinde L-tipi Ca⁺² kanal akımlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. CSE^{-/-} farelerde pankreas adacıklarından insülin salınımının yabanıl farelere kıyasla yükseldiği tespit edilmiş, NaHS uygulamasının ise glukozla indüklenen insülin salınımını doz bağımlı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada eksojen ve endojen H₂S'in L-tipi Ca⁺² kanal aktivitesini ve pankreastan insülin salınımını inhibe ettiğini gösterilmiştir (Tang ve ark. 2013).

Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada endojen ve eksojen H₂S'in p38 MAPK aktivasyonu aracılığıyla endoplazmik retikulum stresini artırarak INS-1E hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Yang ve ark. 2007). Başka bir araştırmada ise, yüksek konsantrasyondaki glukozun pankreatik β -hücrelerinde CSE ekspresyonunu ve H₂S oluşumunu arttırdığı, eksojen H₂S'in yüksek glukozla

indüklenen β -hücre apoptozunu inhibe ettiği ve bu yolla β hücrelerini glukotoksisiteye karşı koruduğu ortaya konmuştur (Kaneko ve ark. 2009).

2.9. Nitrik Oksit, Karbon Monoksit ve Hidrojen Sülfür İlişkisi

Gazotransmitter ailesinin üyeleri olan NO, CO ve H₂S'in birbirleriyle etkileşerek biyolojik yanıtlarını kontrol ettikleri ve birbirlerinin biyosentezinden sorumlu enzimlerin ekspresyonlarını ve/veya aktivitelerini etkiledikleri düşünülmektedir . Güçlü bir vazodilatatör olan NO endotel tabakasında üretilmektedir. İlk olarak Hosoki ve arkadaşları H₂S ve NO arasındaki sinerjik etkiye dikkat çekerek NaHS'nin NO donörleri (Sodyum nitroprusiyat, 10 nM; 3-morfolinosidnonimin, 30 nM) varlığında anlamlı olarak daha güçlü bir gevşeme cevabı meydana getirdiğini bildirmiştir (Hosoki ve ark. 1997). H₂S' in etkisinin endotel tabakası ile ilişkilendirildiği çalışmalarda, endotel tabakasının mekanik olarak uzaklaştırılmasının veya eNOS'un L-NAME (L-nitro-arjinin-metilester) ile inhibisyonunun H₂S' in izole damarlardaki etkisinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Zhao ve ark. 2001). Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) ve NO salınımına aracılık eden düşük kondüktanslı Ca²⁺ ile aktive olan potasyum kanallarının apamin ve karibdotoksin kombinasyonu ile inhibisyonunun, H₂S ile görülen gevşeme cevabını azalttığı belirlenmiştir (Zhao ve ark. 2001; Cheng ve ark. 2004). Söz konusu sonuçlar, H₂S ile gözlenen gevşeme cevaplarının kısmen endotel bağımlı ve NO ve/veya EDHF salınımı aracılı olduğunu göstermektedir.

Zhao ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada, vasküler düz kas hücre kültüründe NO donörleri (SNP, SNAP), H₂S üretimini ve CSE ekspresyonunu arttırmıştır (Zhao ve ark. 2001). İzole sıçan aorta ve insan umbilikal ven endotel hücrelerinde yürütülen bir çalışmada, NaHS'nin eNOS ekspresyonunu ve aktivitesini azalttığı, nNOS (nöronal NOS) ve iNOS (indüklenabilir NOS)'u ise etkilemediği öne sürülmüştür. eNOS'un Ser-1177 noktasından Akt aracılı fosforilasyonu eNOS aktivasyonu için önemli bir adımdır. Aynı çalışmada H₂S'in Akt fosforilasyonunda azalmaya neden olduğu; eNOS aktivitesi, eNOS fosforilasyonu ve Akt fosforilasyonu üzerindeki inhibitör etkilerinin glibenklamid ile bloke olduğu bildirilmiştir (Geng ve

ark. 2007). Çalışmanın bulguları H_2S 'in, K_{ATP} kanallarını aktive etmesini takiben Akt fosforilasyonunda azalmaya neden olduğu ve eNOS fosforilasyonunu inhibe ederek eNOS aktivasyonunu azalttığını öne sürmektedir. Kubo ve arkadaşları tarafından yürütülen bir diğer çalışmada NaHS, rekombinant eNOS tarafından katalize edilen [^3H]-arjinin'in [^3H]-sitrülin'e dönüşümünü inhibe etmiştir (Kubo ve ark. 2007a). Çalışma H_2S 'in düşük konsantrasyonlarında görülen kasılma cevaplarının, eNOS'un H_2S tarafından direkt inhibisyonu ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir. Aynı çalışma grubunun yürüttüğü bir diğer çalışmada, NaHS'nin rekombinant NOS izoformlarının aktivitesi üzerine etkileri in vitro olarak incelenmiş ve iNOS, eNOS, nNOS aktivitesinin NaHS tarafından inhibe edildiği öne sürülmüştür. NOS enziminin kofaktörü olan tetrahidrobiopterin (BH_4) uygulamasının nNOS ve eNOS'un NaHS tarafından inhibisyonunu geriye döndürdüğü, iNOS inhibisyonunu ise etkilemediği bildirilmiştir (Kubo ve ark. 2007b).

Oh ve arkadaşlarının lipopolisakkarit (LPS) ile stimüle edilen RAW264.7 makrofajlar üzerinde yürüttüğü çalışmada, NaHS'nin LPS ile indüklenen iNOS ekspresyonunu ve NO üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. NaHS'nin doza bağımlı olarak ERK yolağı aktivasyonu aracılığıyla HO-1 (hem oksijenaz) ekspresyonunu indüklediği, makrofajlara HO inhibitörü (Tin protoporfirin IX) uygulamasının veya HO-1 ekspresyonu down regülasyonunun (HO-1 siRNA ile) H_2S 'in iNOS ekspresyonu ve NO üretimi üzerindeki inhibitör etkilerini geriye döndürdüğü ileri sürülmüştür (Oh ve ark. 2006). Çalışma H_2S 'in LPS ile stimüle edilen makrofajlarda, HO-1 ekspresyonu aracılığı ile iNOS ekspresyonunu ve NO üretimini inhibe ettiğini öne sürmektedir. Sıçanlarda hipoksik pulmoner hipertansiyon modeli oluşturulan bir başka çalışmada, sıçanlara 3 hafta boyunca intraperitoneal yoldan uygulanan NaHS (14 $\mu\text{mol/kg/gün}$)'nin, pulmoner arterlerde HO-1 protein ve mRNA ekspresyonunda ve plazma CO konsantrasyonunda artışa neden olduğu öne sürülmüştür (Qingyou ve ark. 2004).

2.10. Lipid Raftlar

Lipid raftlar, sfingolipid ve kolesterolden zengin özelleşmiş plazma membran mikrodomanleridir. Lipid raft kavramı ilk olarak epitel hücrelerindeki glikolipidden zengin apikal membranın oluşumunu açıklamak için ortaya konmuştur (Simons ve Van Meer 1988). Hareketli platformlar olarak davranan lipid raftlar, membrandaki bitişik bölgelerden farklı özellikler gösterirler ve endositoz, transsitoz, sinyal transdüksiyonu gibi olaylarda önemli rol oynarlar (Simons ve Ikonen 1997). Boyutlarının küçüklüğü nedeniyle tek başlarına fonksiyonları olmayan raftların fonksiyon gösterebilmeleri bir araya toplanmaları ile mümkün olur. Sinyal transdüksiyonunda görev alan bir çok protein lipid raft mikrodomanlerinde bulunmaktadır. Flotillin, kaveolinler ve anneksinler gibi scaffolding (iskele) proteinler lipid raftların sitoplazmik yaprağında yer alırken, glikozilfosfatidilinozitol (GPI)-bağlı proteinler hücre dışı yaprakta yerleşmiştir. Non reseptör kinazlardan olan src ailesinin üyeleri, G proteinleri ve kolesterol bağlayıcı proteinler lipid raft fonksiyonuna aracılık eden diğer proteinlerdir (Reeves ve ark. 2012).

2.11. Kaveola

Kaveola, organizmada birçok hücre tipinde bulunan 60-80 nm çapındaki plazma membran invajinasyonlarıdır (Simons ve Ikonen 1997). İlk olarak 1953 yılında Palade tarafından kapiller damarlarda ve 1955 yılında Yamada tarafından fare safra kesesi epitelinde tanımlanmıştır (Yamada 1955; Palade 1961). Lipid raftların özelleşmiş bir alt grubunu oluşturan kaveola, endotel hücrelerinde ve adipositlerde bol miktarda bulunmaktadır (Bastiani ve Parton 2010).

Kaveolaların ana membran komponenti bir integral membran proteini olan kaveolinlerdir. Memelilerde kaveolin-1, kaveolin-2 ve kaveolin-3 olmak üzere molekül ağırlıkları 22-24 kDa olan üç adet kaveolin proteini tanımlanmıştır. Kavolin-1'in kaveolin-1 α ve kaveolin-1 β olmak üzere iki izoformu, kaveolin-2'nin kaveolin-2 α , kaveolin-2 β ve kaveolin-2 γ olmak üzere üç izoformu vardır. Kaveolin proteinleri yaklaşık 33 aminoasid uzunluğunda olan membrana yerleşik bir hidrofobik kısma sahip

olup, amino ve karboksil terminalleri membranin sitozolik kısmında yer almaktadır. Amino terminal domaini diğer sinyal proteinleri ve kaveolin proteinleri ile etkileşebilen kaveolin ‘scaffolding (iskele) domain’ içermektedir (Thomas ve Smart 2008). Kaveolinler hücrede granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenmekte ve golgi aygıtı boyunca taşınarak plazma membranına iletilmektedirler. Golgi aygıtında homo ve hetero-oligomerik kompleksler oluşturan kaveolinler, golgiden yaklaşık 100-200 kaveolin molekülünün meydana getirdiği gruplar şeklinde ayrılmaktadırlar (Hansen ve Nichols 2010).

Kaveolin-1 ve kaveolin-2 birlikte genel olarak düz kas hücrelerinde, endotel hücrelerinde, adipositlerde ve fibroblastlarda yüksek miktarlarda eksprese olurken, kaveolin-3 ağırlıklı olarak çizgili kaslarda ve kalp kasında eksprese olmaktadır (Bastiani ve Parton 2010).

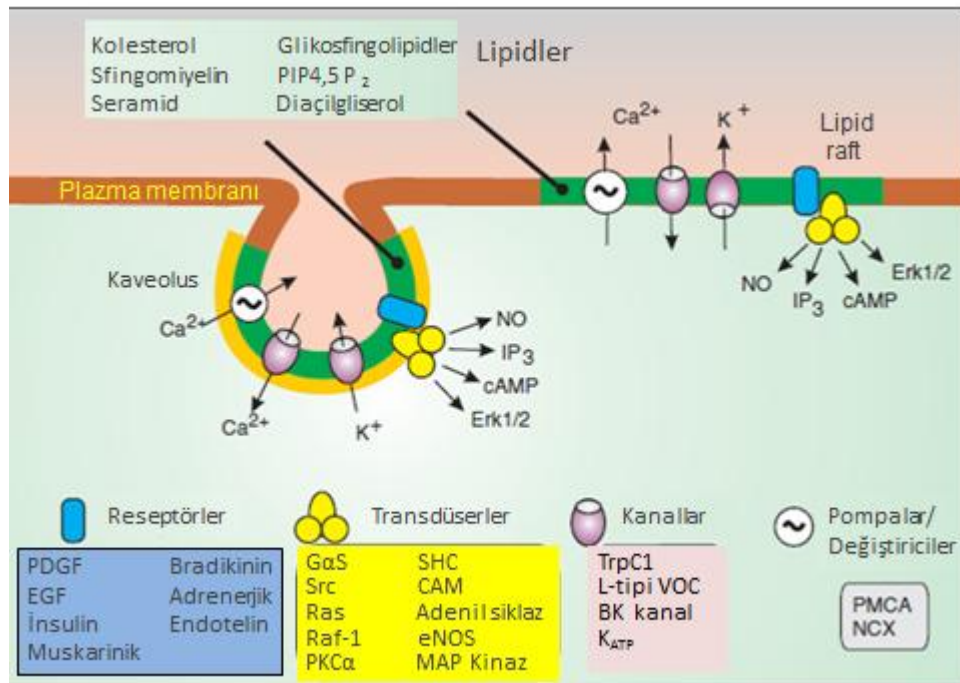
Kaveolin geni silinmiş farelerde yapılan çalışmalar, kaveolinlerin kaveola formasyonundaki esansiyel rolünü ortaya koymuştur. Kaveolin-1 geni silinmiş farelerde tüm kas dışı dokularda, kaveolin-3 geni silinmiş farelerde ise iskelet kas fiberlerindeki kaveola miktarında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Kaveolin-2, kaveola formasyonu için gerekli olmayıp, plazma membranına taşınması kaveolin-1’e bağımlıdır (Le Lay ve Kurzchalia 2005).

Kaveola formasyonu ve fonksiyonunda kaveolinlerle birlikte rol oynayan diğer bir protein ailesi kavin adı verilen sitoplazmik proteinlerdir. Bu ailenin üyeleri Kavin-1 (PTRF, Polimeraz I ve transkript salım faktörü), kavin-2 (SPDR, Serum deprivasyon cevap proteini), kavin-3 (SRBC, C-kinaza bağlanan serum deprivasyon cevap faktör ilişkili gen ürünü) ve kavin-4 (MURC, Kasla sınırlı çift kıvrımlı protein)’tür. Tüm kavin proteinleri protein-protein etkileşimleri için bir lösün zipper-like domaine ve protein dönüşümü için PEST domainlerine (prolin, glutamik asid, serin ve treoninden zengin) sahiptirler (Chidlow ve Sessa 2010).

Hücre kültürlerinde ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda kavin-1’in yokluğu kaveola kaybına neden olmuştur (Hill ve ark. 2008; Liu ve ark. 2008). Kavin-1 geni silinmiş farelerde kaveolin miktarları anlamlı bir şekilde azalmıştır (Liu ve ark.

2008). Ayrıca kavin-1 yokluğu nedeniyle görülen kaveola kaybı kaveolin degradasyonu, lipid ve kas hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (Hill ve ark. 2008; Liu ve ark. 2008).

Kavin-2 ve kavin-3 protein kinaz C (PKC) substratları olup protein kinaz C'nin kaveolaya hedeflenmesinde rol oynamaktadırlar (Parton ve Pozo 2013). Kavin-4 esas olarak kalp kası ve iskelet kasında eksprese edilmekte olup, miyojenez, RhoA-ROCK aracılı kas hipertrofisi, ERK1/2 sinyalizasyonu ve kalp kasında atrial natriüretik peptid (ANP) transkripsiyonunun düzenlenmesi ile ilişkilendirilmektedir (Ogata ve ark. 2008; Tagawa ve ark. 2008).



Şekil 2-2: Kaveola organizasyonu ve sinyalizasyon fonksiyonu (Berridge 2012'den değiştirilerek)

Kaveolin oligomerleri plazma membranına hedeflendikten sonra yaklaşık 60-80 kavin molekülünün oluşturduğu kavin kompleksi tarafından membranda stabilize edilmektedirler (Hayer ve ark. 2010). Kavin-1, kavin kompleksinin plazma membranına hedeflenmesinde esansiyel bir rol üstlenmektedir (Bastiani ve ark. 2009). Kavin ailesinin dört üyesi de fosfatidilserin'e bağlanabilmektedir. Fosfatidilserin özellikle kaveoladan zengin bölgelerde plazma membranının sitoplazmik yüzünde bol miktarda

bulunmaktadır. Kavin kompleksinin membrana hedeflenmesinde kaveoladaki fosfatidilserin ile bağlanmasının ve kaveolada bulunan kaveolinleri veya kaveolinden zengin domainleri spesifik bir şekilde tanıyıp bağlanmasının etkili olduğu düşünülmektedir (Parton ve Pozo 2013).

2.12. Kaveola ve Endotel Fonksiyonu

Endotel hücreleri yüksek miktarda kaveolin-1 eksprese eden hücre tiplerinden biridir ve bunun bir sonucu olarak yüksek miktarda kaveola içermektedirler. Bir çok sinyal molekülünün vasküler endotel hücrelerin kaveolalarında lokalize olduğu bilinmektedir. Tirozin kinaz reseptörleri (Örn: VEGF reseptör 2), G protein ile kenetli reseptörler (Örn; bradikinin reseptör 2, endotelin reseptörü, muskarinik reseptör), TGF- β tip I ve II reseptörler (transforming growth factor-beta), heterotrimerik G protein alt birimleri (Örn; Gq), eNOS ve kalsiyum kanalları (TRPC1 ve 4, TRPV 4) endotel hücrelerin kaveolasında lokalize olduğu bilinen proteinlerdir (Sowa 2012).

2.12.1. Kaveola ve eNOS İlişkisi

Damar endotelinde NO üretiminden sorumlu olan enzim endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)'ın kaveolada lokalize olduğu bilinmektedir (Feron ve ark. 1996). Çeşitli gruplar tarafından yapılan çalışmalar eNOS'un, kaveolin-1 scaffolding (iskele) domain (CSD) ile direkt olarak etkileştiğini göstermiştir (Garcia-Cardena ve ark. 1997; Ju ve ark. 1997). CSD'ye bağlı hücreye geçirgen peptid kullanılarak yapılan in vivo bir çalışmada endotel bağımlı NO salınımı inhibe olmuş ve peptidin farelere sistemik uygulanması akut inflamasyon ve vasküler permeabiliteyi bir eNOS inhibitörü ile benzer derecede baskılamıştır (Bucci ve ark. 2000). Çalışma eNOS aktivitesinin kaveolin-1 tarafından negatif olarak düzenlendiğini göstermektedir. Bazal koşullarda sadece kaveolada yer alan kaveolin-1'in eNOS aktivitesini inhibe etmesi lipid raflarda yer alan kaveolinlerin ise bu inhibisyonu sağlayamaması, eNOS'un kaveolin-1 tarafından inhibisyonu için kaveola formasyonu ve lokalizasyonunun gerekliliğini ortaya koymuştur (Sowa ve ark. 2001).

Plazma membranında kaveolaya hedeflenen eNOS ve kaveolin-1'in etkileşimi enzimin sterik inhibisyonuna neden olmaktadır. Agonist stimülasyonu ile meydana gelen intraselüler kalsiyum düzeylerindeki artış veya gerilim stresi (shear stres) eNOS'un allosterik modülatörü olan kalmodulin ve hsp90 proteininin enzime bağlanmasına neden olmaktadır. Kalmodulin eNOS'un kaveolinden ayrılmasından sorumludur. Ardından eNOS'un aktive olan Akt tarafından Ser-1177 noktasından fosforilasyonu NO salınımına neden olmaktadır (Dessy ve ark. 2010).

Kaveolin-1 geni silinmiş farelerde yürütülen çalışmalar bazal NO salınımının ve sGMP üretiminin normal farelere kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir (Drab ve ark. 2001; Razani ve ark. 2001). Ayrıca kaveolin-1 geni silinmiş farelerden izole edilen aortalarda endotel aracılıklı bir vazodilatatör olan asetilkolin cevaplarının anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir. Kaveolin-1 ve kaveola kaybının eNOS'un hiperaktivasyonuna neden olduğu görülmektedir.

Kaveolin-1'in genetik olarak silinmesi ve eş zamanlı kaveola kaybı NO sentezinde, vasküler reaktivite ve permeabilitede bozukluklara ayrıca kardiyak hipertrofi, pulmoner hipertansiyon, pulmoner hiperplazi gibi ciddi kardiyovasküler ve pulmoner rahatsızlıklara yol açabilmektedir (Drab ve ark. 2001; Razani ve ark. 2001; Yu ve ark. 2006). Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kaveolin-1 kaybına sekonder olarak gelişen kronik eNOS aktivasyonunun pulmoner hipertansiyona yol açtığı gösterilmiştir. Kaveolin-1 geni silinmiş farelerde görülen pulmoner vasküler yeniden şekillenme ve pulmoner hipertansiyon, kaveolin-1 ve eNOS geni silinmiş (double knockout) farelerde görülmemiştir. Bununla birlikte kaveolin-1 geni silinmiş farelere L-NAME muamelesi pulmoner vasküler patolojiyi geriye döndürmüştür. eNOS aktivasyonuna bağlı olarak gelişen nitrozatif stresin PKG nitrasyonuna ve inaktivasyonuna neden olmasının kaveolin-1 geni silinmiş farelerde görülen pulmoner hipertansiyona aracılık ettiği düşünülmektedir (Zhao ve ark. 2009).

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar, kaveolin-1 geni silinmiş fareler ile yabanıl fareler arasında sistemik kan basınçları açısından anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur (Rahman ve Sward 2009). Benzer şekilde telemetri sistemi ile

farelerde kan basıncı ölçümünün yapıldığı bir çalışmada, kaveolin-1 geni silinmiş fareler ile yabani farelerin kan basıncı değerleri arasında bir fark görülmediği, buna karşın kaveolin-1 geni silinmiş farelerin dolaşımındaki Hb-NO (nitrozil-hemoglobin) düzeylerinde artış görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, NO sentezinin kaveolin-1 tarafından regülasyonunun santral kan basıncını düzenlemede önemli bir rolü olduğunu ve Hb-NO'nun sistemik kan basıncı için bir tampon görevi gördüğünü öne sürmektedir (Desjardins ve ark. 2008). Kaveolin-1 geni silinmiş hayvanlarda kaveolin-1'in kronik kaybına bağlı olarak ortaya çıkan sürekli eNOS hiperaktivasyonunun kompensatuar mekanizmalar devreye soktuğu ve bu nedenle kaveolin-1 geni silinmiş hayvanlar ile yabani hayvanlar arasında sistemik arteriyel kan basıncı açısından bir fark görülmediği düşünülmektedir.

2.12.2. İntraselüler Kalsiyumun Düzenlenmesi ve EDHF Yolağı

Kalsiyum iyon translokasyonunda görev alan çok sayıda molekül kaveolada lokalize olmakta ve eNOS aktivasyonu dahil olmak üzere hücre sinyalizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Pani ve Singh 2009). TRPC (Geçici reseptör potansiyeli olan katyon) kanal ailesinin üyeleri hücre içine kapasitatif kalsiyum girişi diğer adıyla depo-kontrollü (store-operated) kalsiyum influksunda rol oynamaktadırlar. TRPC1'in N- ve C-terminali kaveolin-1 ile direkt olarak etkileşmektedir. Bu etkileşim TRPC1'in membran lokasyonu ve Ca^{+2} influksunun düzenlenmesi için esansiyeldir. Murata ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda kaveolin-1 geni silinmiş farelerin endotel hücrelerinde, kalsiyum depo deplesyonu nedeniyle görülen hücre içine kalsiyum iyon girişinin ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, TRPC1 ve TRPC4 kanalları arasındaki protein-protein etkileşimleri ve kanalların membran lipid raflara hedeflenmeleri bozulduğu ve bu hücrelerde kaveolin-1'in yeniden ekspresyonunun TRPC1 ve TRPC4 arasındaki etkileşimi ve lipid raflara hedeflenmeyi düzelterek hücre içine kalsiyum iyon girişini sağladığı bildirilmiştir (Murata ve ark. 2007). Endotel hücrelerinde kaveolin-1'in hücre içine kalsiyum iyon girişini düzenlemede kritik bir rol oynadığı görülmektedir.

TRP kanal ailesinin diğerk bir üyesi olan TRPV4 kanalları endotel hücrelerinde yer almakta ve yüksek kalsiyum iyon permeabiliteleri nedeniyle vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Gerilim stresi (Shear stres) ve düşük pH gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal uyarılarla aktive olabilen TRPV4 kanalları, endotelyal mekanotransdüksiyonda önemli rol oynamaktadır. Son çalışmalar kaveolin-1 geni silinmiş farelerde gözlenen EDHF ile indüklenen gevşeme cevabı ve hücre içine kalsiyum girişindeki bozuklukları TRPV4 kanalları ile ilişkilendirmiştir. Kaveolin-1 geni silinmiş farelerden izole edilen mezenterik arterlerde EDHF-aracılı gevşeme cevabının tamamen ortadan kalktığı bildirilmiştir (Saliez ve ark. 2008). SK_{Ca} kanallarının kaveolinden zengin lipid domainlerinde yer aldığı, IK_{Ca} kanallarının ise kaveolin-1'den bağımsız hücresel fraksiyonlarda bulunduğu gösterilmiştir. Bu modelde TRPV4 kanalları hücre içine Ca⁺² girişini sağlayarak K_{Ca} kanallarının açılmasına, membran hiperpolarizasyonuna ve EDHF aracılı gevşeme cevabına neden olmaktadır. Membran hiperpolarizasyonu kaveolada yer alan SK_{Ca} kanalları aracılığıyla gerçekleşebileceği gibi kaveolada yer almayan IK_{Ca} kanalları aracılığıyla da oluşabilmektedir (Rath ve ark. 2009).

Myoendotelyal gap kavşakları (MEGJ), vasküler endotelyal hücre ve vasküler düz kas hücreleri arasında yer alarak elektriksel ve kimyasal sinyalleri iletebilen bir gap kavşak türüdür. Gap kavşakları her biri altı connexin proteininden oluşan iki connexon altbiriminin kenetlenmesi ile oluşmaktadırlar. Cx37, 40, 43 ve 45 adı verilen connexin alt tipleri başlıca vasküler sistemde yer almaktadır (Rath ve ark. 2009). Kaveolin-1 geni silinmiş farelerde yürütölen çalışmada, kaveolin-1 geni silinmiş farelerin arterlerinde yabancı farelere göre daha az gap kavşak olduğu ve connexin 37, 40 ve 43'ün ekspresyonunun yabancı farelere oranla daha az olduğu görölmüştür (Saliez ve ark. 2008). Yapılan çalışmalar kaveolin-1 ve kaveolanın, EDHF sinyalizasyonunun farklı basamaklarında yer alan TRPV4 kanallarının ve connexin'lerin membrana lokalizasyonunu ve aktivitesini modöle etmek suretiyle EDHF aracılı gevşeme cevabının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir.

2.12.3. Mekanotransdüksiyon

Kaveolanın mekanotransdüksiyondaki rolü ilk olarak *in situ* sıçan perfüze akciğer modelinde çalışılmıştır. Perfüze akciğerde akışın ve basıncın artırılması, kaveolada lokalize olan proteinlerin tirozin fosforilasyonuna, eNOS aktivasyonuna, çeşitli sinyal moleküllerinin kaveolaya translokasyonuna ve sonuçta Ras/Raf/ERK MAPK yolağının aktive olmasına neden olmuştur (Rizzo ve ark. 1998a; Rizzo ve ark. 1998b). İnsan endotel hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, shear strese maruz kalan endotel hücrelerinde plazma membran kaveola yoğunluğunda artış meydana geldiği ve kaveolin-1'in golgiden plazma membranına taşındığı gözlenmiştir (Sun ve ark. 2002). Ayrıca kolesterol deplesyonu yapan ilaçların, akış stimülasyonu altında akışa duyarlı proteinlerin aktivasyonunu engellediği gösterilmiştir. β -siklodekstrin (kolesterol deplesyonu yaparak kaveolaların yapısını bozar) ERK'nin akış aktivasyonunu inhibe etmiş (Park ve ark. 1998) ve siklosporin A (kaveolaların yapısını bozmadan kolesterol deplesyonu yapar) akışla indüklenen eNOS fosforilasyonunu azaltmıştır (Lungu ve ark. 2004).

Kaveolin-1 geni silinmiş, yabanıl ve kaveolin-1'in endotel hücrelerinde yeniden eksprese edildiği kaveolin-1 geni silinmiş farelerde yapılan bir diğer çalışmada, kaveolin-1 geni silinmiş farelerden izole edilen karotid arterlerde yabanıl farelere kıyasla akış bağımlı dilatasyonun anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Dilatasyon cevabındaki azalmanın kaveolin-1'in yeniden ekspresyonu ile düzeldiği ifade edilmiştir (Yu ve ark. 2006). Endotel hücrelerinde kaveolin-1 ve kaveolanın shear stresteki değişiklikleri algılayan önemli sensörler oldukları ve vasküler sistemde mekanotransdüksiyon için gerekli yapılar oldukları görülmektedir.

2.12.4. Makromoleküllerin Transportu

Makromoleküllerin transsitozu kaveola için önerilen ilk fonksiyonel rollerden biridir. Makromoleküllerin damar lümeninden subendotelyal boşluğa taşınması şeklinde gerçekleşen transsitoz, konstitütif veya reseptör aracılı olarak gerçekleşebilmektedir. Albumin, insülin, demir-transferrin, LDL ve kemokinler kaveolar transsitoza uğradığı

bilinen moleküllerdir (Sowa 2012). Albumin transportunun kaveolada lokalize olan gp60 reseptörü aracılığıyla gerçekleştiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar kaveolanın albüminin endotelial transsitozunda görev aldığını ve kaveolin-1 geni silinmiş farelerin endotel hücrelerinde albümin transsitozunun gerçekleşmediğini göstermiştir (Schubert ve ark. 2001).

2.13. Kaveola ve Anjiogenez

Anjiogenez sürecinde rol oynayan VEGF reseptörleri (VEGFR), ürokinaz reseptörü (uPAR), eNOS ve TGF- β reseptörleri gibi önemli sinyal proteinleri kaveolada lokalize olmaktadır. Yapılan çalışmalar kaveolin-1'in anjiogenezin regülasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Kaveolin-1 geni silinmiş farelerde, Matrigel modeli kullanılarak bFGF (basit fibroblast büyüme faktörü) ile indüklenen anjiogenezin araştırıldığı bir çalışmada, yabancıl farelere kıyasla kaveolin-1 geni silinmiş farelerde anjiogenezin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Woodman ve ark. 2003). Tümör ile indüklenen anjiogenezin incelendiği *in vivo* modellerde, kaveolin-1 geni silinmiş farelerde tümör ağırlığı, hacmi ve damar yoğunluğunun azalmış olduğu görülmüştür (Woodman ve ark. 2003; Chang ve ark. 2009). RM-9 prostat kanser hücrelerinin farelere implante edildiği bir başka çalışmada ise, kaveolin-1 geni silinmiş farelerde hem tümör gelişiminin hemde anjiogenezin azaldığı tespit edilmiştir (Tahir ve ark. 2008). Kaveolin-1'in proanjiogenik rolünü destekleyen bir diğer çalışmada, kaveolin-1'in adenoviral overekspresyonu veya hücreye geçirgen kaveolin-1 scaffolding (iskele) domain ile muamelenin kapiller benzer tüp formasyonunu arttırdığı, kaveolin-1 ekspresyonunun azalması ile bu prosesin de azaldığı gösterilmiştir (Liu ve ark. 2002).

Kaveolin-1'in proanjiogenik etkili olduğunu gösteren çalışmalar yanında, anti-anjiogenik etkili olduğunu öne süren *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda mevcuttur. Subkütan olarak Lewis akciğer karsinoma (LLC) hücreleri implante edilen farelerin, lipozom kaveolin-1 plazmid kompleksi ile transfeksiyonunun tümör gelişimini geciktirdiği gösterilmiştir (Brouet ve ark. 2005). Bir diğer çalışmada LLC tümörlerinin implante edildiği kaveolin-1 geni silinmiş farelerde, tümör gelişim hızında, anjiogenezde ve tümör vasküler permeabilitesinde anlamlı bir artış gözlenmiş ve

kaveolin-1 geni silinmiş farelere hücreye geçirgen kaveolin-1 scaffolding domain uygulaması tümör vasküler hiperpermeabilitesini ve tümör gelişimdeki artışı önlemiştir (Lin ve ark. 2007).

Çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılığın, tümör gelişim ve angiogenez evrelerine, kullanılan deney hayvanlarının yaşı ve genetik özgeçmişine ve proangiogenik uyarıya bağlı olduğu düşünülmektedir. Düşük proangiogenik uyarı varlığında kaveolin-1'in antianjiogenik rol üstlenebileceği, daha yüksek uyarılarda ise proangiogenik etkili olabileceği öne sürülmektedir.

2.14. Kaveola ve Ateroskleroz

Kaveolin-1'in proaterojenik etkili olduğu düşünülmektedir. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) reseptörü olan SR-B1 ve LDL'nin modifiye formu için süpürücü reseptörlerden olan CD36 kaveolada yer almaktadır. Okside LDL, kaveolada kaveolin-1 ve eNOS lokalizasyonunu bozabilmekte ve asetilkolinle indüklenen eNOS aktivasyonunda azalmaya neden olabilmektedir (Blair ve ark. 1999). ApoE geni silinmiş farelerin ilave olarak kaveolin-1 geni silinmiş hale getirildiği bir çalışmada, kaveolin-1 kaybı aterosklerotik lezyon oluşumunu önemli derecede inhibe etmiş, CD36 ve VCAM-1 (Vasküler hücre adhezyon molekül-1) gibi proaterojenik moleküllerin ekspresyonunda ise azalma meydana gelmiştir. Aynı çalışmada kaveolin-1 geni silinmiş farelerde plazma LDL düzeyinin yüksek olması, LDL'nin periferik dokulara alınmasında ve/veya taşınmasında bir bozukluk olduğunu göstermekte ve bu durum kaveolanın LDL transsitoz prosesindeki rolü ile örtüşmektedir (Frank ve ark. 2004). Daha yeni bir çalışmada kaveolin-1 ve ApoE geni silinmiş (double knockout) farelerde aterosklerozun ilerlemesinde görülen inhibisyon, endotele spesifik kaveolin-1'in yeniden ekspresyonu ile ortadan kalkmıştır. Deney hayvanlarında kaveolin-1 kaybı, arter duvarına LDL infiltrasyonunu azaltmış, NO üretimini arttırmış ve VCAM-1, ICAM-1, E-selektin gibi lökosit adhezyon moleküllerinin ekspresyonlarını azaltmıştır (Fernandez-Hernando ve ark. 2009). Yapılan çalışmalar endotel hücrelerinde eksprese edilen kaveolin-1'in, fare ateroskleroz modellerinde proaterojenik bir rol üstlendiğini göstermektedir.

2.15. Kaveola ve Miyokardiyal Fonksiyon

Kardiyak hipertrofi, basınç yada volüm yüklenmesinden kaynaklanan hemodinamik stres nedeniyle kardiyomiyositlerde meydana gelen boyut artışı olarak tanımlanabilmektedir. Kalp yetmezliği gelişiminin ve kardiyak yeniden şekillenmenin kritik bir belirteçidir. Hemodinamik strese maruz kalan ventriküler miyositlerde hipertrofiye işaret eden morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Kaveolin-1 geni silinmiş fareler üzerinde yürütülen bir çalışmada, söz konusu farelerde kardiyak hipertrofi geliştiği, izole edilen kardiyak fibroblastlarda p42/44 MAPK yolağının aktive olduğu, eNOS ve iNOS düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Kardiyak fibroblastlarda aktive olan p42/44 MAPK yolağının büyüme faktörlerinin salınımını arttırdığı ve bunu takiben kardiyak miyositlerde hipertrofi cevabının geliştiği düşünülmektedir (Cohen ve ark. 2003). Kaveolin-1 geni silinmiş farelerde yürütülen diğer bir çalışmada, kaveolin-1'in genetik kaybının kardiyak miyosit boyutlarında artışa ve interstisyel fibrozis ile karakterize kardiyak hipertrofiye neden olduğu gösterilmiştir (Augustus ve ark. 2008). Ayrıca kaveolin-1 geni silinmiş farelerin pulmoner arter basınçlarında önemli ölçüde bir artış ve sağ ventriküllerinde hipertrofi gözlenmiştir (Zhao ve ark. 2002). Kaveolin-1'in genetik kaybının, direkt olarak kalp kası hücreleri üzerine ve indirekt olarak pulmoner değişikliklere neden olarak ventrikül fonksiyonlarını etkilediği görülmektedir.

Başlıca çizgili kaslarda (kardiyak ve iskelet kası gibi) ve düz kaslarda eksprese edilen kaveolin-3'ün kas hücrelerinin farklılaşması esnasında eksprese olduğu, sarkolemmada lokalize olduğu ve burada distrofin ve distrofinle ilişkili proteinler ile etkileştiği bildirilmiştir. Artmış ya da azalmış kaveolin-3 ekspresyonu kaveolin-3/distrofin kompleks bütünlüğünde değişiklik yapmakta, bu durum iskelet kaslarında distrofik durumlar ortaya çıkarmaktadır. Kaveolin-3, kardiyak miyositlerde endojen olarak eksprese edilmekte ve NOS aktivitesini negatif olarak düzenlemektedir (Gratton ve ark. 2004). Woodman ve arkadaşlarının kaveolin-3 geni silinmiş fareler üzerinde yürüttüğü çalışmalarda, 4 aylık farelerde kalpte hipertrofi, ventriküler dilatasyon ve kontraktilitede azalma ile karakterize kardiyomiyopati geliştiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada kaveolin-3 geni silinmiş farelerin kalplerinde p42/44 MAPK (ERK1/2) yolağının aktive olduğu ileri sürülmüştür (Woodman ve ark. 2002). Başka bir çalışmada

kaveolin-1 ve kaveolin-3 geni silinmiş (double knockout) 2 aylık farelerde, kaveolin-1 geni silinmiş, kaveolin-3 geni silinmiş ve yabani farelere kıyasla sol ventrikül duvar kalınlığında dramatik bir artış olduğu gözlenmiştir. Kaveolin-1 ve kaveolin-3 geni silinmiş farelerde kardiyak hipertrofinin biyokimyasal bir belirteci olan atriyal natriüretik faktör (ANP) düzeyinde artış olduğu ve sol ventrikül hipertrofisi ve dilatasyonu ile karakterize şiddetli kardiyomiyopati geliştiği ileri sürülmüştür (Park ve ark. 2002).

Farelerde kaveolin-3'ün transgenik overekspresyonu ise miyosit dejenerasyonu ve deorganizasyonu ile karakterize kardiyomiyopatiye yol açmıştır. Deney hayvanlarında kardiyak hipertrofi gözlenmediği, hücrel infiltrasyon ve inflamasyonda artış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kalpte yüksek kaveolin-3 düzeylerinin NOS aktivitesini inhibe ettiği öne sürülmüştür (Aravamudan ve ark. 2003).

Kalpte iskemik ön koşullanma ve sonradan koşullanma ile sağlanan korumanın RISK yolağı adı verilen bir sinyalizasyon kaskadı aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Hausenloy ve ark. 2005). RISK yolağının PI3K (fosfatidilinositol 3-kinaz)-Akt, MEK/ERK kinazlar, Src kinazlar, H-Ras, protein kinaz C ve NOS gibi bir çok üyesinin kaveola ve kaveolinlerle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Krajewska ve Maslowska 2004). Kaveola ve kaveolinlerin iskemi reperfüzyon hasarındaki rolünün araştırıldığı bir çalışmada, metil- β -siklodekstrin ile muamele edilen sıçan kardiyak miyositlerinde iskemik ön koşullanma ve opioid aracılı (SNC-121) kardiyak korumanın önemli ölçüde azaldığı öne sürülmüştür. Opioid aracılı kardiyak korumanın kolesterol ile yüklenmiş metil- β -siklodekstrin ile inkübe edilen miyositlerde bozulmadığı bildirilmiştir (Patel ve ark. 2006). Benzer olarak diğer bir çalışmada, metil- β -siklodekstrin ile muamele edilen sıçan kardiyak miyositlerinde ve in vivo olarak kaveolin-3 geni silinmiş farelerde iskemi reperfüzyon hasarına karşı izofluran (uçucu anestezik) ile indüklenen kardiyak koruma ortadan kalkmıştır (Horikawa ve ark. 2008).

Kaveolin-3'ün kardiyak miyositleri iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu rolünün araştırıldığı bir başka çalışma, kardiyak miyosit spesifik kaveolin-3 aşırı ekspresyonu yapılmış transgenik fare modeli (Cav-3 OE) üzerinde yürütülmüştür. İskemik reperfüzyon hasarına tabi tutulan Cav-3 OE farelerde transgenik olmayan

farelere kıyasla infarkt alanında anlamlı bir azalma olduğu, iskemik ön koşullanma ile sağlanan kardiyak korumanın Cav-3 OE fare ve yabanıl fareler arasında fark göstermediği öne sürülmüştür. Cav-3 OE fare kalbinde bazal Akt ve glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3 β) fosforilasyonunun arttığı, Cav-3 OE farelere uygulanan Wortmannin'in (fosfatidilinositol 3-kinaz inhibitörü) bazal Akt ve GSK3 β fosforilasyonunu azalttığı ve kardiyak korumayı bloke ettiği bildirilmiştir (Tsutsumi ve ark. 2008).

2.16. Siklodekstrinler ve Kaveola Deplesyonu

Siklodekstrinler, selülozun bakteriyel sindirimi sırasında oluşan siklik oligosakkaritlerdir. Birbirlerine (α -1,4) bağı ile bağlanmış glikopiranoz ünitelerinden oluşan siklodekstrinler, glikopiranoz ünitelerinin sandalye konformasyonuna sahip olması nedeniyle konik şekle sahiptirler. Altı adet glikopiranoz ünitesi içeren siklodekstrinler alfa (α), yedi adet içerenler beta (β) ve sekiz adet içerenler gama (γ) siklodekstrin olarak adlandırılmaktadır. Hidrofilik bir dış yüzeye ve lipofilik bir merkezi kaviteye sahip olan siklodekstrinler, bunun sonucu olarak hidrofilik ortamda hidrofobik bileşiklere ev sahipliği yapabilmektedirler. Merkezi kaviteye yerleşebilen alkoller, asidler, aminler gibi polar bileşikler ve alifatik, aromatik hidrokarbonlar gibi polar olmayan bileşikler siklodekstrinler ile inklüzyon kompleksleri oluşturabilmektedir. İlaç endüstrisinde başlıca çözünürlük problemi olan ilaçların suda çözünürlüğünü, biyoyararlanımlarını ve stabilitelerini arttırmak amacıyla kullanılmaktadırlar (Loftsson ve ark. 2005).

Siklodekstrinlerin farklı hücrelerde lipid bileşimlerini manipüle etmeleri bir diğer önemli uygulama alanlarıdır. Hücre kültürlerinde ve membran modelleri üzerinde yürütülen bir çok çalışma, hücrelerin β -siklodekstrin ile muamelesinin hücresel kolesterolun uzaklaşmasına neden olduğunu öne sürmektedir (Atger ve ark. 1997; Leventis ve Silvius 2001; Ohvo ve Slotte 1996). Kolesterol deplesyonunun derecesinin kullanılan β -siklodekstrin türevine, konsantrasyonuna, inkübasyon süresine ve çalışılan hücre tipine göre değiştiği bildirilmektedir. β -siklodekstrin'in metillenmiş formu olan metil β -siklodekstrin (M β CD) membran kolesterolüne affinitesi en yüksek olan ve en

sık kullanılan siklodekstrin türevidir (Klein ve ark. 1995). Yürütülen çalışmalarda M β CD inkübasyonu ile görülen kolesterol deplesyon düzeylerinin sıçan kuyruk arterinde (10 mM M β CD, 1 saat) %20 (Dreja ve ark. 2002), mast hücrelerinde (10 mM M β CD, 1 saat) %60 (Sheets ve ark. 1999), fare L-hücre fibroblastlarında (10 mM M β CD, 8 saat) %100 (Kilsdonk ve ark. 1995), sığır aorta endotel hücrelerinde (5 mM M β CD, 2 saat) %90 (Levitan ve ark. 2000) oranında olduğu öne sürülmüştür.

Metil β -siklodekstrin'in kolesterol deplesyonu yapmak suretiyle kaveolar yapı bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu hücre kültürü (Schnitzer ve ark. 1994) ve izole tavşan aortasında (Darblade ve ark. 2001) yürütülen çalışmalar ile gösterilmiştir. Linder ve arkadaşlarının izole sıçan torasik aortasında yürüttüğü çalışmalarda, arterlerin 1 mM metil β -siklodekstrin ile 1 saat inkübasyonunun fenilefrin ile önceden kastırılmış arterlerde asetilkolin ile indüklenen gevşeme cevaplarını etkilemediği, öte yandan arterlerin 10 mM metil β -siklodekstrin ile 1 saat inkübasyonunun ise asetilkolin ile indüklenen gevşeme cevaplarını anlamlı düzeyde azalttığı öne sürülmüştür. Aynı çalışmada 10 mM metil β -siklodekstrin ile 1 saat inkübe edilen dokularda çözünür guanilat siklaz (sGC) aktivatörü olan 3-(5'-hidroksi-metil-2'furyl)-1-benzil indazol (YC-1) ile indüklenen gevşeme cevaplarının gerek endoteli tahrip edilmiş gerekse de endoteli intakt dokularda anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca transmisyon elektron mikroskopisi ile değerlendirilen aortalarda 10 mM metil β -siklodekstrin ile 1 saat süre ile inkübasyonun plazma membranındaki kaveola yapısını ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada sGC, protein kinaz G (PKG) ve protein kinaz A (PKA)'nın kaveolin-1 ile birlikte lokalize olduğu konfokal immünofloresans mikroskopisi ile gösterilmiştir (Linder ve ark. 2005). Çalışma düz kas gevşemesinde rol oynayan NO kaskadının sinyalizasyon molekülleri olan sGC, PKG ve PKA'nın endotelial kaveolada yer aldığını ve kaveolar yapının NO aracılı cevaplarında önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir.

Xu ve arkadaşlarının izole sıçan aorta, renal arter ve mezenterik arter üzerinde yürüttüğü çalışmalarda ise, M β CD (10^{-3} M, 1 saat) inkübasyonunun fenilefrin ile önceden kastırılmış aortalarda asetilkolin ile indüklenen gevşeme cevaplarında anlamlı olarak azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Endoteli tahrip edilmiş aortalarda M β CD (10^{-3} M, 1 saat) inkübasyonu SNP aracılı gevşeme cevaplarında değişikliğe yol

açmamıştır. Aynı çalışmada kaveola deplesyonu yapan bir başka ajan olan filipin (4×10^{-6} g/L, 20 dk) inkübasyonunun da aorta, renal arter ve mezenterik arterlerde asetilkolin ile indüklenen gevşeme cevaplarında anlamlı bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmada M β CD ve ya filipin inkübasyonunun, aortada sadece NO aracılı gevşeme cevabını renal arterlerde ise hem NO hem de EDHF aracılı gevşeme cevabını etkilediği bildirilmiştir. Mezenterik arterlerin filipin ile inkübasyonu ise sadece EDHF aracılı gevşeme cevabında azalmaya neden olmuştur (Xu ve ark. 2007). Çalışma endotelial kaveolanın yapısının bozulmasının hem NO hem de EDHF yolağını etkilemek suretiyle asetilkolinle indüklenen gevşeme cevaplarında bozulmaya yol açtığını öne sürmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Çalışmamızda aşağıda belirtilen araç ve gereçler kullanılmıştır.

- Poligraf (Powerlab ADInstruments[®])
- Jaketli tip (çift duvarlı) izole organ banyosu
- “Gerim ileticisi” izometrik transdüser
- Termostatlı sirkülasyonlu su banyosu (Grant[®])
- Distile su cihazı (Milipore[®])
- Vorteks (IKA[®])
- Karışım (%5 CO₂ + % 95 O₂) Gaz Tüpü
- Mikropipet 1-10, 5-50, 50-100, 100-1000µl
- Cerrahi makas ve pens
- Paslanmaz çelikten L-şeklindeki doku tutucuları
- Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C,-20 °C, Arçelik; -80 °C, Daihan)
- ‘ADInstruments Powerlab Chart 5 for Windows’ yazılım programı

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları

Noradrenalin (Sigma[®]): Stok çözeltisi 10⁻² M olarak 0,001N HCl’de hazırlanmıştır. Stok çözeltinin hazırlanması sırasında maddenin stabilizasyonunu sağlamak için 1mg/ml konsantrasyonunda askorbik asit (Merck[®]) ilave edilmiştir. Stok çözeltisi ve dilüsyonlar ışıktan korunmuştur.

Potasyum Klorür (Merck[®]): Stok çözeltisi 10⁻²M olarak distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Asetilkolin HCl (Sigma[®]): Stok çözeltisi 10⁻²M olarak 0,001N HCl’de hazırlanmıştır.

Sodyum Nitroprusiyat (Sigma[®]): Stok çözeltisi 10⁻⁴M olarak distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Stok çözeltisi ve dilüsyonlar ışıktan korunmuştur.

Sodyum hidrojen sülfür (NaHS): Stok çözeltisi 10^{-1} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

N^G-nitro-L-Arginin (L-NOARG): Stok çözeltisi 10^{-2} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Glibenklamid: Stok çözeltisi 10^{-2} M olarak DMSO'da hazırlanmıştır.

4-aminopiridin (4-AP): Stok çözeltisi 1 M olarak DMSO'da hazırlanmıştır.

Metil beta siklodekstrin (M β CD): Stok çözeltisi 1M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Deney sırasında kullanılan çözeltiler derin dondurucuda (-20 °C) saklanan stoklardan her deney gününde Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisinde dilüe edilerek taze olarak hazırlanmıştır. Deneyde kullanılan Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisinin mM/L cinsinden içeriği şu şekildedir: NaCl; 118, KCl; 7,5, NaHCO₃; 25, MgSO₄.7H₂O; 1,2, CaCl₂; 1,8, KH₂PO₄; 1,2, Glukoz; 1,1, Disodyum EDTA; 0,026.

3.3. İzole Safen Ven Preparatlarının Hazırlanması

Greft materyali olarak kullanılan safen ven, İ.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı ve Gaziosmanpaşa Avrupa Şafak Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi Kliniği'nde gerçekleştirilen koroner bypass operasyonlarından temin edilmiştir. Etik kurul izni İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (14.01.2014 tarihli Sayı:B.08.06. YÖK.2.İ.Ü.E.50.0.05.00/01). Koroner bypass operasyonu sırasında alınan safen ven greft örnekleri (1- 1.5 cm) +4°C'deki Krebs solüsyonu içerisinde laboratuvar ortamına transfer edilmiştir. Safen venlerin çevre dokuları endotel ve düz kas tabakasına zarar vermeden dikkatlice temizlendikten sonra, tüm dokular 2-3 mm'lik halkalar haline getirilmiştir. Halkalar L-şeklindeki paslanmaz çelik tutuculara geçirilerek Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisi (37°C) içeren ve %5 CO₂+ %95 O₂ ile havalandırılan izole organ banyo sistemine takılmıştır. Tutucuların bir ucu organ banyosu içerisinde bulunan kancaya diğer ucu ise transdüserin ucuna takılarak yerleştirilmiştir. Daha sonra dokular optimum olduğu belirlenen 2 g'lık ön gerim altında 2 saat süreyle dengelenmeye

bırakılmıştır. Dengelenme süresi içerisinde banyo çözeltisi her 15 dakikada bir değiştirilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar KCl (40mM) ile 20'şer dakika arayla iki defa kastırılarak standardize edilmiştir. 2 g'ın altında kasılan dokular deney dışı bırakılmıştır. Her doku örneğinden 2-4 preparat hazırlanmış ve aynı hastanın dokuları paralel olarak çalışılmıştır.

3.4. Deney Protokolü

Standardizasyon işleminden sonra deneye alınan dokular kaveolar yapı bütünlüğünün H₂S cevaplarındaki rolünü değerlendirmek amacıyla 2 gruba ayrılmıştır.

I. Grup: Kaveolar yapısı intakt olan dokular (Kontrol grubu)

II. Grup: Kaveola deplesyonu yapılan dokular

Kaveola deplesyonu sağlamak amacıyla dokular metil betasiklodesktrin (M β CD, 10⁻² M, 1 saat) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından banyo içerisindeki çözelti değiştirilmek suretiyle deplese edilen yapıların banyo içerisinden uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Her iki gruptaki safen ven preparatlarının öncelikle endotel fonksiyonları test edilmiştir. Bu amaçla izole safen ven halkaları nonselektif bir α agonist olan noradrenalinin submaksimal kasılma sağlayan konsantrasyonları (NA, 10⁻⁷-10⁻⁶ M) ile kastırılmış ve kasılma cevabı platoya ulaştıktan sonra endotel bağımlı gevşetici bir ajan olan asetilkolin (Ach, 10⁻⁸-10⁻⁴M) artan konsantrasyonlarda kümülatif olarak uygulanmıştır. Dokuların endotel fonksiyonu Ach'nin oluşturduğu maksimum gevşetici etki üzerinden değerlendirilmiştir.

Endotel fonksiyonunun incelenmesinin ardından, kaveolar yapısı intakt olan, diğer bir deyişle kaveola deplesyonu yapılmamış (Kontrol) ve kaveola deplesyonu yapılmış izole insan safen venlerinde H₂S donörü NaHS (Sodyum hidrojen sülfür)'in konsantrasyon bağımlı etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla,

NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan damarlara, NaHS artan konsantrasyonlarda kümülatif olarak (10^{-9} - 3×10^{-3} M) uygulanmıştır.

NaHS'nin izole insan safen veni üzerindeki etkisine aracılık eden mekanizmaları aydınlatmaya yönelik yürütülen çalışmalarda ise, NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılmış izole insan safen venlerde, NaHS'in etkisi NO sentezine aracılık eden NOS enziminin spesifik inhibitörü L-NOARG (10^{-4} M, 20 dk), ATP duyarlı potasyum kanalı (K_{ATP}) inhibitörü Glibenklamid (10^{-5} M, 20 dk) ve voltaj bağımlı potasyum kanalı (K_v) inhibitörü 4-aminopiridin (2×10^{-3} M, 20 dk) varlığında değerlendirilmiştir.

Deneylerin sonunda dokuların düz kas gevşeme kapasitesi endotelden bağımsız gevşetici bir ajan olan sodyum nitroprusiyat (SNP) ile test edilmiştir. SNP'nin (10^{-8} - 10^{-4} M) konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisi NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan dokularda değerlendirilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Ach, SNP ve NaHS'in gevşetici etkisi NA ile elde edilen ön kasılma boyutunda oluşan azalmaya göre belirlenmiş ve “% gevşeme” olarak ifade edilmiştir. “% gevşeme” değerinin belirlenmesi için kastırıcı ajanın oluşturduğu ön kasılma “% 100” olarak alınmış ve gevşetici ajanın etkisiyle ön kasılmada oluşan azalmaların yüzdesi bu değere göre hesaplanmıştır.

Gevşeme yönünde etki gösteren maddelerin “ pD_2 ” (maksimum gevşemenin % 50'sini oluşturan agonist konsantrasyonun – log değeri, - log EC_{50}) değerleri probit regresyon analizi ile her konsantrasyon cevap eğrisi için tek tek hesaplanarak, ortalamaları alınmıştır. Uygulanan gevşetici ajanın oluşturduğu maksimum gevşeme cevabı “ E_{maks} ” olarak ifade edilmiştir.

Deneylerdeki “n” sayısı dokuların alındığı hasta sayısını göstermektedir. Tüm sonuçlar “ortalama $\pm$ SEM” şeklinde verilmiştir. Deney sonuçlarının istatistiksel olarak

değerlendirilmesi Student's t-testi (gruplar arası farkın anlamlılık testi) ile çift yönlü varyans analizi (ANOVA) ve sonrasında Bonferonni çoklu karşılaştırmalar testi aracılığıyla yapılmıştır. 0,05'den küçük "p" değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Klinik Özellikleri

Deneylerde 6 kadın ve 16 erkek olmak üzere toplam 22 hastadan alınan safen ven greftleri çalışılmıştır. Hastaların yaş ortalamaları $64,8 \pm 2,49$ 'dur. 10 hastada anjina pektoris, 8 hastada hiperkolesterolemi, 13 hastada hipertansiyon, 17 hastada diyabet bulunmaktadır. Hastaların klinik özellikleri Tablo 4-1'de gösterilmiştir

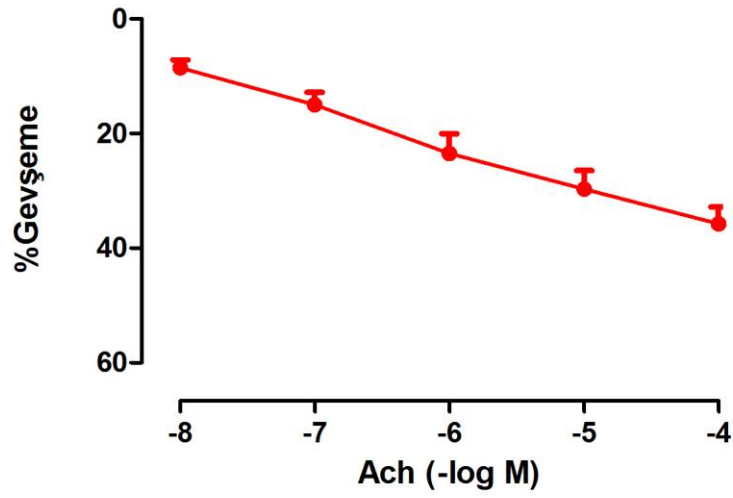
4.2. İzole İnsan Safen Venlerinin Endotel ve Düz Kas Gevşeme Cevaplarının İncelenmesi

4.2.1. Asetilkolinin Etkisi

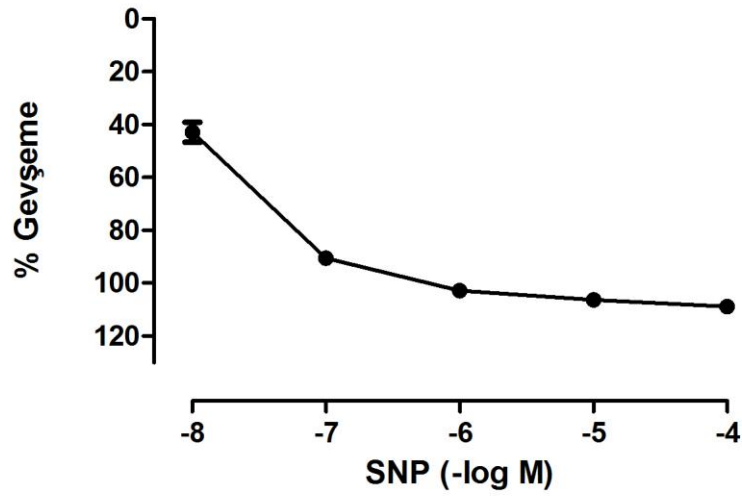
İzole insan safen venlerinin endotel fonksiyonunun belirlenmesi amacıyla NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan venlere kümülatif olarak Ach (10^{-8} - 10^{-4} M) uygulanması konsantrasyon bağımlı gevşeme cevaplarına neden olmuştur (Şekil 4-1). Ach'nin oluşturduğu maksimum gevşetici etki (E_{maks}) ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerleri Tablo 4-2'de verilmiştir.

4.2.2. Sodyum Nitroprussiyatın Etkisi

İzole insan safen venlerinin düz kas gevşeme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan venlere kümülatif olarak SNP (10^{-8} - 10^{-4} M) uygulanması konsantrasyon bağımlı gevşeme cevaplarına neden olmuştur (Şekil 4-2). SNP'nin oluşturduğu maksimum gevşetici etki (E_{maks}) ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerleri Tablo 4-2'de verilmiştir.



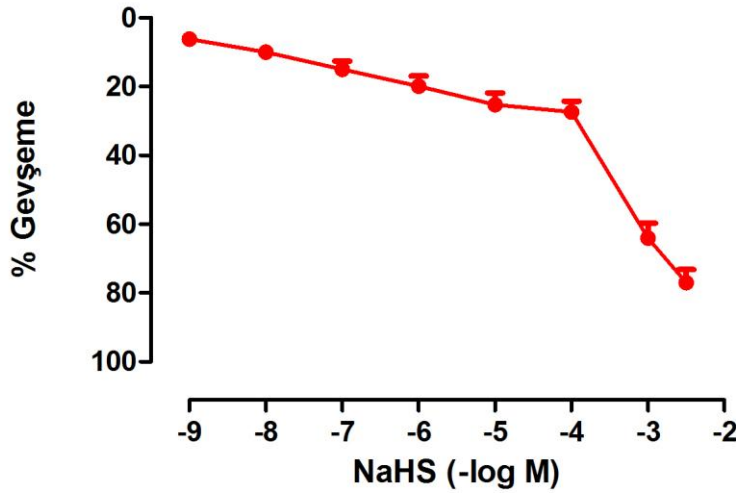
Şekil 4-1: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerine kümülatif olarak Ach (10^{-8} - 10^{-4}) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrileri (n=22).



Şekil 4-2: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde kümülatif olarak SNP (10^{-8} - 10^{-4}) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrileri (n=22)

4.3. İzole İnsan Safen Ven Preparatlarında Hidrojen sülfür'ün (10^{-9} - 3×10^{-3}) Etkisi

NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen ven preparatlarına H_2S donörü olan NaHS'in (10^{-9} - 3×10^{-3} M) kümülatif olarak uygulanması damarlarda konsantrasyon bağımlı gevşeme cevaplarına neden olmuştur (Şekil 4-3). NaHS'nin oluşturduğu maksimum gevşetici etki (E_{maks}) ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerleri Tablo 4-2'de verilmiştir. Bir grup deneyde, NaHS'in daha yüksek konsantrasyonlarının (10^{-2} M) ilave bir gevşeme cevabına neden olmadığı, aksine kasılma cevabına neden olduğu gözlenmiştir.

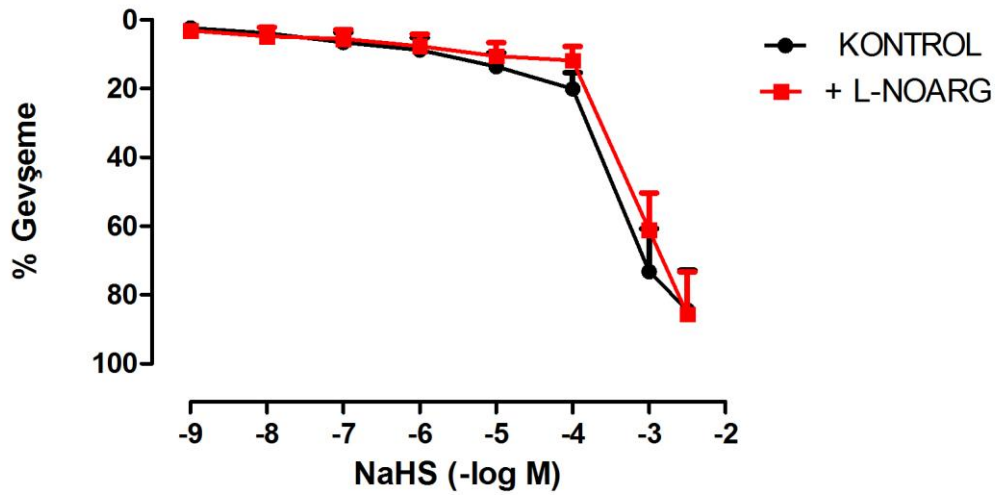


Şekil 4-3: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılmış izole insan safen venlerine kümülatif olarak NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrileri (n=22).

4.4. Hidrojen sülfür'ün İzole İnsan Safen Venlerindeki Gevşetici Etkisine Aracılık Eden Mekanizmasının İncelenmesi

4.4.1. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörü L-NOARG'ın Etkisi

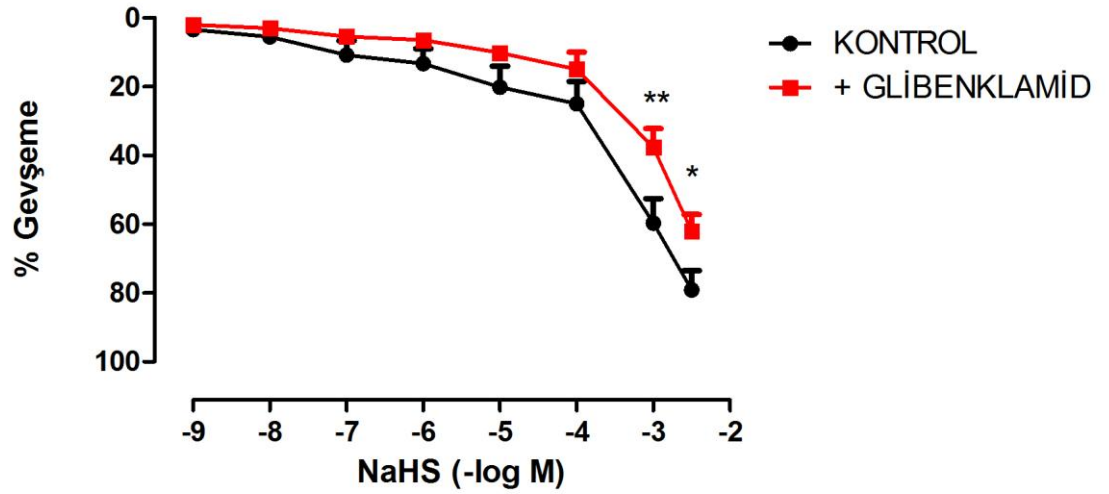
NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılmış izole insan safen venlerinin NOS inhibitörü L-NOARG (10^{-4} M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'nin (10^{-9} - 3×10^{-3} M) maksimum gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, pD_2 değerlerinde ise anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur. NaHS'nin L-NOARG varlığında ve yokluğunda oluşturduğu maksimum gevşetici etki (E_{maks}) ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerleri Şekil 4-4 ve Tablo 4-3'te verilmiştir.



Şekil 4-4: Kontrol ve NOS inhibitörü L-NOARG (10^{-4} M, 20 dk) ile inkübe edilen izole insan safen venlerinde NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=7). $p > 0.05$

4.4.2. K_{ATP} Kanal İnhibitörü Glibenklamid'in Etkisi

NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılmış izole insan safen venlerinin K_{ATP} kanal inhibitörü glibenklamid (10^{-5} M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'nin (10^{-9} - 3×10^{-3} M) gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4-5). NaHS'nin glibenklamid varlığında ve yokluğunda oluşturduğu maksimum gevşetici etki (E_{maks}) ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerleri Tablo 4-3'de verilmiştir.

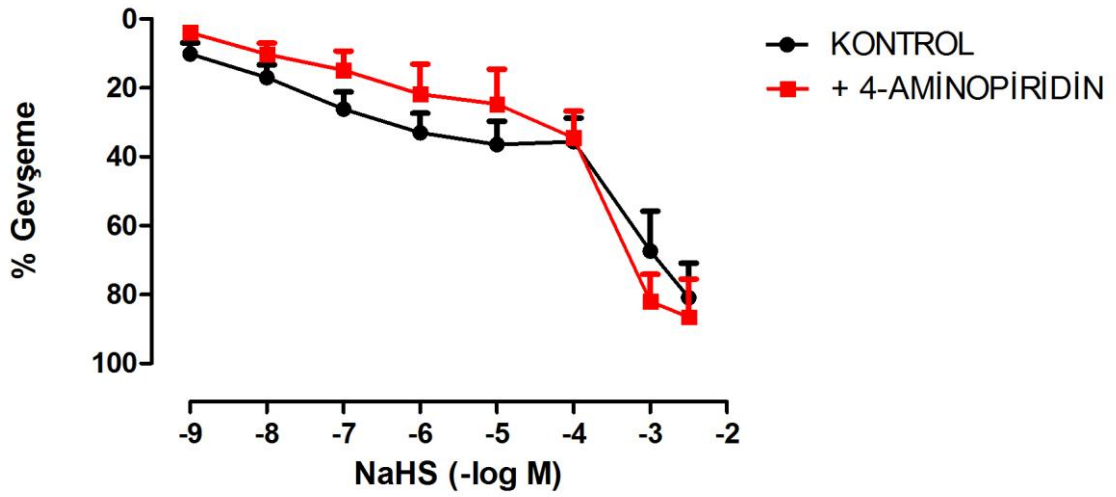


Şekil 4-5: Kontrol ve K_{ATP} kanal inhibitörü Glibenklamid (10^{-5} M, 20 dk) ile inkübe edilen izole insan safen venlerinde NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=8).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

4.4.3. K_v Kanal İnhibitörü 4-aminopiridin'in Etkisi

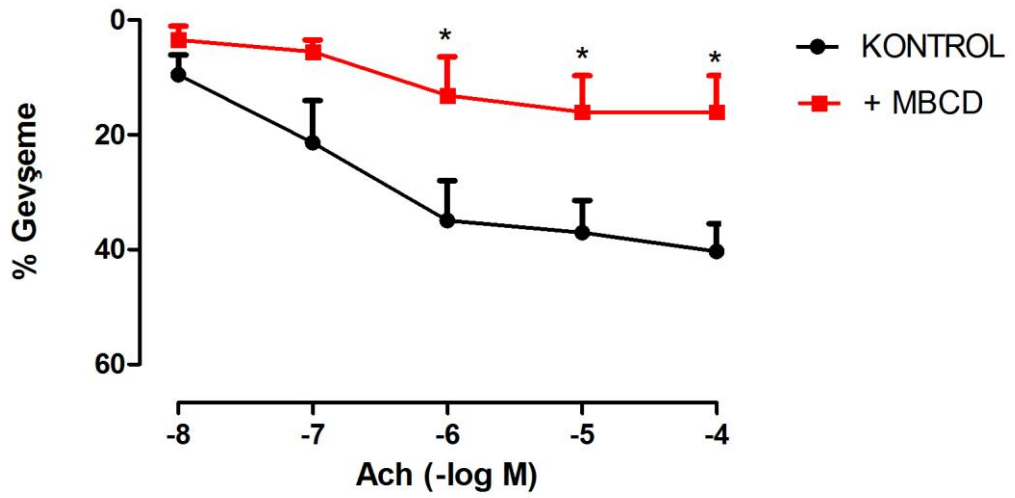
NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılmış izole insan safen venlerinin K_v inhibitörü 4-aminopiridin (2×10^{-3} M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'nin (10^{-9} - 3×10^{-3} M) maksimum gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır (Şekil 4-6). NaHS'nin oluşturduğu maksimum gevşetici etki ve EC₅₀ değerleri Tablo 4-3'de verilmiştir.



Şekil 4-6: Kontrol ve K_v kanal inhibitörü 4-aminopiridin (2×10^{-3} M, 20 dk) ile inkübe edilen izole insan safen venlerinde NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=6). $p > 0.05$

4.5. Kaveola Deplesyonu Yapılan İzole İnsan Safen Ven Preparatlarında Asetilkolin'in Etkisi

MβCD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde Ach'in (10^{-8} - 10^{-4} M) konsantrasyon bağımlı gevşetici etkisinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4-7). Ach'in oluşturduğu maksimum gevşetici etki (E_{maks}) ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerleri Tablo 4-4'de verilmiştir.

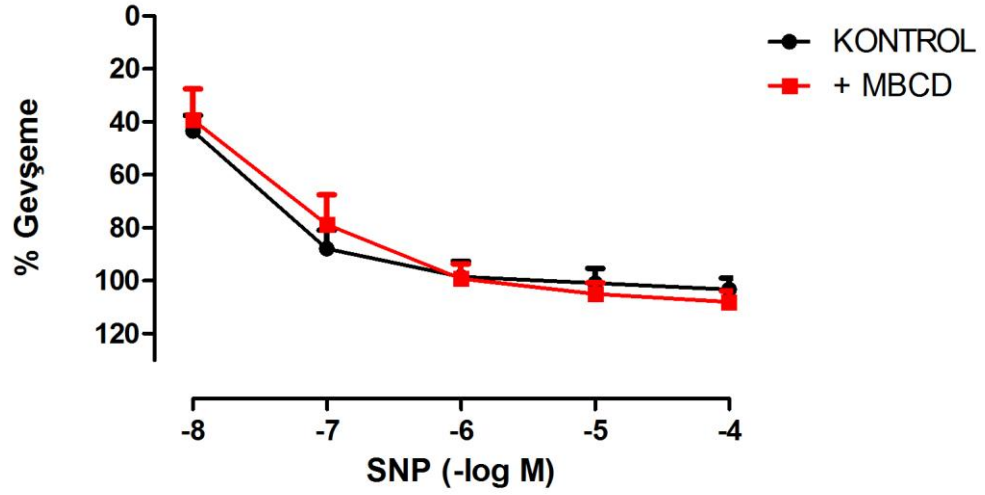


Şekil 4-7: Kontrol ve MβCD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde Ach (10^{-8} - 10^{-4}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=5).

* $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

4.6. Kaveola Deplesyonu Yapılan İzole İnsan Safen Ven Preparatlarında Sodyum Nitroprussiyatın Etkisi

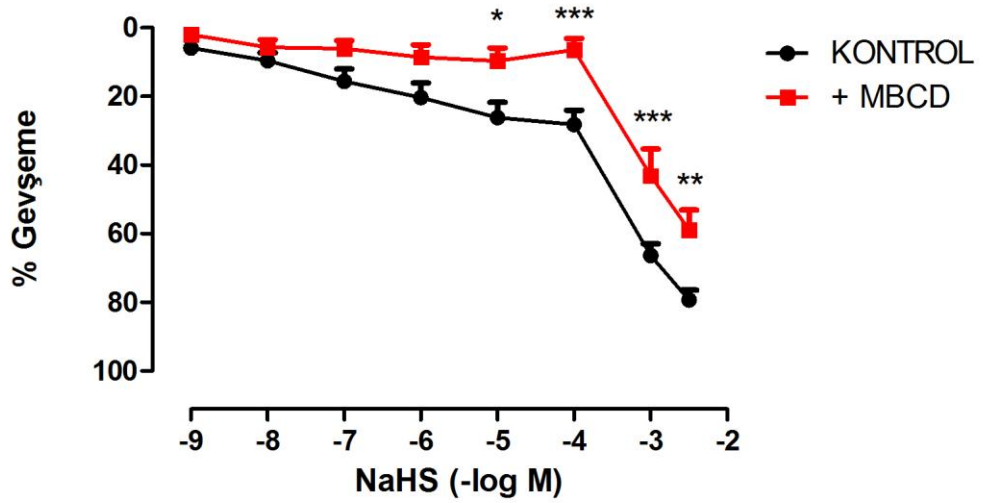
MβCD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde SNP'nin (10^{-8} - 10^{-4} M) konsantrasyon bağımlı gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (Şekil 4-8). SNP'nin oluşturduğu maksimum gevşetici etki (E_{maks}) ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerleri Tablo 4-4'de verilmiştir.



Şekil 4-8: Kontrol ve MβCD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde SNP (10^{-8} - 10^{-4}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=7). $p>0.05$

4.7. Kaveola Deplesyonu Yapılan İzole İnsan Safen Ven Preparatlarında Hidrojen Sülfür'ün Etkisi

MβCD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde, H_2S donörü NaHS'in (10^{-9} - 3×10^{-3} M) gevşeme cevaplarında ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir (Şekil 4-9). NaHS'nin oluşturduğu maksimum gevşetici etki (E_{maks}) ve pD_2 ($-\log EC_{50}$) değerleri Tablo 4-4'de verilmiştir.



Şekil 4-9: Kontrol ve MβCD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan ve NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinde NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen konsantrasyon-cevap eğrisi (n=14)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

4.8. Tablolar

Tablo 4-1: Koroner Bypass Operasyonuna Giren Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

Hastaların özellikleri	n
Cinsiyet	22
Kadın	6
Erkek	16
Yaş (ortalama± standart hata)	64,8±2,49
Hastalıklar	
Anjina pectoris	10
Hiperkolesterolemi	8
Hipertansiyon	13
Diyabet	17
Kullandıkları ilaçlar	
Ca ⁺² kanal blokerleri	7
Beta blokerler	15
Nitrovazodilatörler	12
ACE inhibitörleri	5
Diüretikler	4
HMG KoA Redüktaz İnhibitörleri	2
Oral antidiyabetikler	8
Operasyon sırasında kullanılan ilaçlar	
Ca ⁺² kanal blokerleri	15
Nitrovazodilatörler	7

n: Hasta sayısı

Tablo 4-2: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen ven preparatlarında Ach, sodyum nitroprusiyat ve NaHS'in E_{maks} ve pD_2 değerleri

	Ön kasılma düzeyi (g)	E_{maks}	pD_2	n
Ach	5,46±0,59	35,81±2,96	5,93±0,22	22
SNP	6,59±0,83	108,85±2,03	7,92±0,17	22
NaHS	5,60±0,49	77,12±3,85	3,61±0,23	22

E_{maks} : NA ile ön kasılmaya göre % gevşeme değerleri
 pD_2 : $-\log EC_{50}$
n: Hasta sayısı

Tablo 4-3: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen ven preparatlarının L-NOARG (10^{-4} M, 20dk), glibenklamid (10^{-5} M, 20 dk) ve 4-aminopiridin (2×10^{-3} M, 20 dk) ile inkübasyonunun NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}) ile elde edilen E_{maks} ve pD_2 değerlerine etkisi.

	Ön kasılma düzeyi (g)	E_{maks}	pD_2	n
Kontrol	5,28±0,43	84,52 ±11,62	3,35±0,08	7
+ L-NOARG	4,85±0,61	85,65±12,30	2,95±0,11***	7
Kontrol	5,11±0,72	79,20±5,68	3,29±0,16	8
+ Glibenklamid	4,89±0,66	62,18±9,41*	2,48±0,53	8
Kontrol	6,17±0,69	83,05±9,44	3,37±0,63	6
+ 4-aminopiridin	6,08±1,40	90,08±8,79	4,34±0,57	6

E_{maks} : NA ile ön kasılmaya göre % gevşeme değerleri
 pD_2 : $-\log EC_{50}$
n: Hasta sayısı

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Tablo 4-4: NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen ven preparatlarının M β CD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübasyonunun NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3}), Ach (10^{-8} - 10^{-4}) ve SNP (10^{-8} - 10^{-4}) ile elde edilen E_{maks} ve pD₂ değerlerine etkisi.

	Ön kasılma düzeyi (g)	E _{maks}	pD ₂	n
NaHS				
Kontrol	8,09±0,21	79,43 ±2,9	3,90±0,32	14
+M β CD	7,89±0,85	60,26±5,58**	2,94±0,21*	14
Ach				
Kontrol	4,40±0,21	40,38±4,85	6,73±0,38	5
+ M β CD	5,40±0,47	16,10±6,36*	6,26±0,33	5
SNP				
Kontrol	9,66±1,00	103,39±4,40	7,97±0,26	7
+ M β CD	9,79±1,29	108,02±4,11	7,87±0,58	7

E_{maks}: NA ile ön kasılmaya göre % gevşeme değerleri

pD₂: -logEC₅₀

n: Hasta sayısı

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

H₂S, karbonmonoksit (CO) ve nitrik oksit'ten (NO) sonra üçüncü gazotransmitter olarak kabul edilmektedir. Gazotransmitterler; biyolojik membranlardan kolayca difüze olabilen, endojen olarak üretilebilen, fizyolojik konsantrasyonlarında biyolojik yolları/fonksiyonları etkileyebilen, spesifik hedef moleküllerinin varlığı ile karakterize gazlardır (Wang 2002). CO ve NO'ya benzer olarak H₂S de çeşitli enzimler ile endojen olarak sentezlenmekte, kardiyovasküler sistemin düzenlenmesi (Hosoki ve ark. 1997; Elrod ve ark. 2007; Kiss ve ark. 2008; Webb ve ark. 2008), hücre proliferasyonu ve apoptozu (Yang ve ark. 2004; Rinaldi ve ark. 2006; Pyriochou ve ark. 2007; Cai ve ark. 2007), glukoz metabolizması (Ali ve ark. 2007), nörotransmisyon (Abe ve Kimura 1996) ve inflamasyon (Li ve ark. 2006; Hu ve ark. 2007) gibi bir çok fizyolojik ve patolojik süreci etkilemektedir.

H₂S'in kardiyovasküler sistemde homeostazın sağlanmasında önemli bir rolü olduğu görülmektedir. Önceden kastırılan sıçan portal ven ve torasik aortasında (Hosoki ve ark. 1997), sıçan mezenterik arterinde (Cheng ve ark. 2004), sıçan pulmoner arterinde (Wang ve ark. 2008), sıçan hepatik arterinde (Fiorucci ve ark. 2005), sıçan kuyruk arterinde (Zhao ve ark. 2001), sıçan koroner arterinde (Cheang ve ark. 2010), sığır siliyer arterinde (Chitnis ve ark. 2013) ve sıçan serebral arterinde (Streeter ve ark. 2012; Tian ve ark. 2012) H₂S'in konsantrasyon bağımlı gevşetici etkileri gözlenmiştir. H₂S'in vasküler etkisinin türlere, damar yatağına, endotel tabakasının durumuna, kastırıcı ajana, konsantrasyona, uygulama yöntemi ve süresine bağlı olarak değiştiği gözlenmektedir.

H₂S'in deney hayvanı kaynaklı çeşitli damar yataklarında gevşetici etkisini gösteren pek çok çalışma olmasına karşın, insan kaynaklı damar yataklarında H₂S'in direkt etkisinin değerlendirildiği çalışmalar izole insan internal meme arteri ile yürütülen tek bir çalışma ile sınırlıdır (Webb ve ark. 2008). Bu bağlamda, çalışmamızda koroner bypass operasyonlarında sıklıkla kullanılan bir greft materyali olan izole insan

safen ven yatağında, H_2S 'in konsantrasyon bağımlı etkilerinin ve bu etkiye aracılık eden mekanizmaların aydınlatılması hedeflenmiştir. Çalışmamızın sonuçları, NA ile önceden kastırılan izole insan safen ven preparatlarına H_2S donörü olan NaHS'in (10^{-9} - 3×10^{-3} M) kümülatif olarak uygulanmasının konsantrasyon bağımlı gevşeme cevaplarına neden olduğunu göstermiştir. NaHS'in daha yüksek konsantrasyonun (10^{-2} M) ise ilave bir gevşemeye değil, aksine kasılma cevabına neden olduğu da gösterilmiştir.

Sıçan aortası, fare aortası (Ali ve ark. 2006; Kubo ve ark. 2007a) ve insan internal mamaryal arteri (Webb ve ark. 2008) gibi damar yataklarında yürütülen çalışmalarda H_2S 'in düşük konsantrasyonlarının (10 - 100 μ M) kasılma cevabı oluşturduğu, yüksek konsantrasyonlarının (100 - 1000 μ M) ise aynı damar yataklarında gevşeme cevabına neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise, H_2S 'in düşük konsantrasyonları izole insan safen venlerinde herhangi bir kasılma cevabına neden olmamıştır.

NaHS'in izole insan safen veni üzerindeki etkisine aracılık eden mekanizmaları aydınlatmaya yönelik yürütülen çalışmalarda, NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılmış izole insan safen venlerinde, NaHS'in etkisi NO sentezine aracılık eden NOS enziminin inhibitörü L-NOARG (10^{-4} M, 20 dk), K_{ATP} kanal inhibitörü Glibenklamid (10^{-5} M, 20 dk) ve K_v kanal inhibitörü 4-aminopiridin (2×10^{-3} M, 20 dk) varlığında değerlendirilmiştir.

NA (10^{-7} - 10^{-6} M) ile önceden kastırılan izole insan safen venlerinin NOS inhibitörü L-NOARG (10^{-4} M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS (10^{-9} - 3×10^{-3} M) aracılı gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, pD_2 değerlerinde ise anlamlı düzeyde bir azalmaya neden olmuştur. pD_2 değerlerindeki azalma NaHS'in izole insan safen venleri üzerindeki gevşetici etkisinde NO'nun pozitif bir katkısı olabileceğine, NO sentezinin baskılanması durumunda dokuların NaHS'e karşı duyarlılığının azalabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda, izole insan safen venlerinin K_{ATP} kanal inhibitörü glibenklamid (10^{-5} M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in yüksek konsantrasyonları (10^{-3} M ve 3×10^{-3} M) ile gözlenen gevşeme cevaplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur. Zhao ve arkadaşları tarafından H_2S 'in etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yürütülen ilk çalışmalarda, H_2S 'in oluşturduğu gevşeme cevabına, membran potansiyelinin kontrolü, enerji metabolizması, apoptozis ve gen ekspresyonu gibi hücrel aktivitelerin düzenlenmesinde rol oynayan K_{ATP} kanallarının aracılık ettiği öne sürülmüştür. Zhao ve arkadaşları, K_{ATP} kanal açıcı olan Pinasidil'in H_2S 'in etkisini taklit ettiğini, K_{ATP} kanal inhibitörü olan glibenklamid'in ise H_2S ile görülen gevşeme cevabını baskıladığını ve yüksek ekstrasellüler K^+ a maruz bırakılan sıçan aortasında H_2S 'in etkisinin anlamlı bir şekilde azaldığını göstermiştir (Zhao ve ark. 2001). İzole sıçan aorta ve mezenterik düz kas hücrelerinde yapılan *patch-clamp* çalışmalarında ise H_2S 'in K_{ATP} kanalları aracılığı ile K^+ akımlarını arttırdığı ve düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona neden olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2001; Tang ve ark. 2005). Hiperpolarizasyon voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının kapanmasına, intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonunun azalmasına ve sonuç olarak dokuda gevşeme cevabının oluşmasına neden olmaktadır. H_2S ve K_{ATP} kanal proteinleri arasındaki etkileşimin incelendiği bir çalışmada, Kir6.1 ve SUR1 alt birimlerinin heterolog olarak eksprese edildiği HEK-293 hücrelerinde, H_2S 'in Kir6.1/SUR1 altbirimlerinin birlikte eksprese olduğu K_{ATP} kanallarını stimüle ettiği, sadece Kir6.1 biriminin oluşturduğu K_{ATP} akımlarını ise etkilemediği görülmüştür. Söz konusu çalışmada, H_2S ve K_{ATP} kanalı arasındaki etkileşimin SUR alt biriminin ekstrasellüler N-terminalinde gerçekleştiğini öne sürmektedir (Jiang ve ark. 2010). Bir başka çalışmada, H_2S 'in Kir6.1 birimindeki sistein-43 sülfhidrillediği, inhibitör olarak etki gösteren ATP'nin bağlanmasını azaltarak ve fosfatidilinositol-4,5-bifosfat'ın Kir6.1 e bağlanmasını arttırarak K_{ATP} aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Mustafa ve ark. 2011). Benzer şekilde, çalışmamızın sonuçları izole insan safen veninde NaHS ile gözlenen gevşeme cevaplarında K_{ATP} kanallarının rolü olduğunu göstermektedir.

İzole sıçan koroner arterlerinde yürütülen bir çalışmada H_2S 'in gevşetici etkisine K_v kanallarının aracılık ettiği bildirilmiştir (Cheang ve ark. 2010). Sıçan ve farelerin izole mezenterik arter ve aortalarında yürütülen bir başka çalışmada ise, H_2S 'in

perivasküler adipoz dokudan salınan bir adiposit kaynaklı gevşetici faktör olabileceği ve etkisini K_v kanallarının bir tipi olan KCNQ kanalları üzerinden gösterdiği belirtilmiştir (Schleifenbaum ve ark. 2010). Çalışmamızda K_v kanal inhibitörü 4-aminopiridin varlığında izole insan safen venlerinde NaHS'in gevşetici etkisinde bir değişiklik gözlenmemiş olması, söz konusu etkide K_v kanallarının rolü olmadığını göstermektedir.

Kaveola, organizmada pek çok hücre tipinde bulunan, primer olarak glikosipingolipidler, kolesterol ve integral membran proteini olan kaveolinlerden oluşmuş özelleşmiş plazma membran invajinasyonlarıdır. G-proteini kenetli reseptörler, IP3 duyarlı kalsiyum kanalları, plazma membran kalsiyum ATPaz pompası, non-reseptör kinazlardan olan src ailesinin üyeleri, protein kinaz C gibi sinyal transdüksiyonunda önemli rol oynayan çeşitli proteinlerin kaveolada yer aldığı gözlemlenmesi kaveolalara sinyal üretim merkezi özelliği kazandırmaktadır (Lisanti ve ark. 1994). Gazotransmitter olarak adlandırılan NO ve CO'nun sentezinden sorumlu olan sırasıyla eNOS (endotelial nitrik oksit sentaz) (Drab ve ark. 2001; Razani ve Lisanti 2001; Razani ve ark. 2001) ve HO-1 (hem oksijenaz-1) gibi enzimlerin (Jung ve ark. 2003; Kim ve ark. 2004) kaveolanın temel proteini olan kaveolin-1 ile fiziksel olarak etkileştiği ve söz konusu enzimlerin aktivitesinin negatif olarak düzenlendiği gösterilmiştir. NO ve CO gibi gazotransmitterlerin etkisinin kaveolanın temel proteini olan kaveolin-1 ile negatif olarak düzenlendiğinin gösterilmiş olmasına karşın, diğer bir gazotransmitter olan H_2S 'in kaveolin-1 ile etkileşimine ilişkin bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Korpus kaverosum dokusunda H_2S donörü olan NaHS'in kaveolin-1 ekspresyonunu etkilemediği öne sürülmüştür (Meng ve ark. 2013). Ancak kaveolinin H_2S sentezinden sorumlu enzimlerin düzenlenmesi ve H_2S ile indüklenen cevaplar üzerindeki etkisi henüz araştırılmamıştır. Ayrıca mevcut literatür verileri incelendiğinde, kaveolanın yapısal bütünlüğünün H_2S ile indüklenen cevaplardaki rolünün değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda kaveolanın yapısal bütünlüğünün H_2S ile indüklenen cevaplar üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi de hedeflenmiştir. Bu amaçla izole insan safen venleri M β CD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveolar yapının deplesyonu sağlanmıştır.

Hücre kültürleri ve membran modelleri üzerinde yürütülen bir çok çalışma, hücrelerin β -siklodekstrin ile muamelesinin hücrel kolesterolün uzaklaşmasına neden olduğunu öne sürmektedir (Atger ve ark. 1997; Leventis ve ark. 2001; Ohvo ve ark. 1996). β -siklodekstrin'in metillenmiş formu olan M β CD membran kolesterolüne affinitesi en yüksek olan ve en sık kullanılan siklodekstrin türevidir (Klein ve ark. 1995). M β CD'nin kolesterol deplesyonu yapmak suretiyle kaveolar yapıları bozduğu hücre kültüründe (Schnitzer ve ark. 1994) ve izole tavşan aortasında (Darblade ve ark. 2001) gösterilmiştir. Linder ve arkadaşlarının izole sıçan torasik aortasında yürüttüğü çalışmalarda, arterlerin 1 mM M β CD ile 1 saat süre ile inkübasyonunun fenilefrin ile önceden kastırılan arterlerde asetilkolin ile indüklenen gevşeme cevaplarını etkilemediği, arterlerin 10 mM M β CD ile 1 saat inkübasyonunun ise asetilkolin ile indüklenen gevşeme cevaplarını anlamlı düzeyde azalttığı öne sürülmüştür. Söz konusu çalışma düz kas gevşemesinde rol oynayan NO kaskadının sinyalizasyon molekülleri olan çözünür guanilat siklaz (sGC), protein kinaz G (PKG) ve protein kinaz A (PKA)'nın kaveolin-1 ile birlikte endotelial kaveolada yer aldığını ve kaveolar yapının NO aracılı cevaplarda önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir (Linder ve ark. 2005). Xu ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada, M β CD (10^{-3} M, 1 saat) inkübasyonunun fenilefrin ile önceden kastırılan aortalarda asetilkolin ile indüklenen gevşeme cevaplarında anlamlı olarak azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Endoteli tahrip edilmiş aortalarda M β CD (10^{-3} M, 1 saat) inkübasyonu SNP aracılı gevşeme cevaplarında değişikliğe yol açmamıştır. Aynı çalışmada kaveola deplesyonu yapan bir başka ajan olan filipin (4×10^{-6} g/L, 20 dk) inkübasyonunun da aorta, renal arter ve mezenterik arterlerde asetilkolin ile indüklenen gevşeme cevaplarında anlamlı bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmada M β CD veya filipin inkübasyonunun, aortada sadece NO aracılı gevşeme cevabını, renal arterlerde ise hem NO hem de EDHF aracılı gevşeme cevabını etkilediği bildirilmiştir. Mezenterik arterlerin filipin ile inkübasyonu ise sadece EDHF aracılı gevşeme cevabında azalmaya neden olmuştur (Xu ve ark. 2007). Çalışma endotelial kaveolanın yapısının bozulmasının hem NO hem de EDHF yolağını etkilemek suretiyle asetilkolinle indüklenen gevşeme cevaplarında bozulmaya yol açtığını öne sürmektedir.

Çalışmamızda, M β CD (10^{-2} M, 1 saat) ile inkübe edilmek suretiyle kaveola deplesyonu yapılan izole insan safen venlerinde literatür ile uyumlu olarak Ach cevaplarının azaldığı, SNP cevaplarının ise değişmediği gözlenmiştir. Kaveola deplesyonu yapılan izole insan safen venlerinde H₂S donörü NaHS'in (10^{-9} - 3×10^{-3} M) konsantrasyon bağımlı gevşeme cevaplarında ve pD₂ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu gözlenmiştir.

Hosoki ve arkadaşları, H₂S ve endotel kaynaklı güçlü bir vazodilatatör olan NO arasındaki sinerjik etkiye dikkat çekerek NaHS'nin NO donörü varlığında anlamlı olarak daha güçlü bir gevşeme cevabı meydana getirdiğini bildirmiştir. H₂S' in etkisinin endotel tabakası ile ilişkilendirildiği çalışmalarda, endotel tabakasının mekanik olarak uzaklaştırılmasının veya eNOS'un L-NAME (L-nitro-arjinin-metilester) ile inhibisyonunun H₂S'in izole damarlardaki etkisinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2001). EDHF ve NO salınımına aracılık eden düşük kondüktanslı Ca²⁺ ile aktive olan potasyum kanallarının apamin ve karibdotoksin kombinasyonu ile inhibisyonunun, H₂S ile görülen gevşeme cevabını azalttığı belirlenmiştir (Zhao ve ark. 2001; Cheng ve ark. 2004). Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon meydana getirerek vazodilatasyona neden olmaktadır. Bu etki özellikle küçük rezistans arterlerde daha belirgindir. Yapılan son çalışmalar, H₂S'in majör bir EDHF olduğunu öne sürmektedir (Mustafa ve ark. 2011). Söz konusu sonuçlar, H₂S ile gözlenen gevşeme cevaplarının kısmen endotel bağımlı ve NO ve/veya EDHF salınımı aracılı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda M β CD ile inkübe edilen izole insan safen venlerinde Ach aracılı gevşeme cevaplarının azalmış olması kaveola deplesyonunun NO/EDHF aracılı cevapların azalmasına neden olduğunu öne süren çalışmaların bulguları ile uyumludur. Gerek L-NOARG ile inkübe edilen kontrol dokularda NaHS cevaplarına duyarlılığının azalması, gerekse de kaveola deplesyonu yapılmış dokularda NaHS aracılı gevşeme cevaplarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalması, H₂S ile gözlenen gevşeme cevaplarının kısmen endotel bağımlı ve NO ve/veya EDHF salınımı aracılı olduğunu öne süren çalışmaları destekler niteliktedir.

K_{ATP} kanallarının kaveolada lokalize olduğu ve kaveolanın ana proteini olan kaveolin-1 ile etkileştiği bildirilmiştir (Sampson ve ark. 2007; Jiao ve ark. 2008). NaHS'in vasküler yapılardaki gevşetici etkisinde K_{ATP} kanallarının önemli bir rol üstlendiği görülmektedir. Çalışmamızda kaveola deplesyonu yapılan izole insan safen venlerinde NaHS ile gözlenen gevşetici etkideki azalmanın kaveola deplesyonuna bağlı olarak K_{ATP} kanallarının lokalizasyonunun değişmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

H_2S 'in kan ve dokulardaki fizyolojik konsantrasyonlarının 1-300 μM arasında olduğunu ileri sürülmüştür (Abe ve Kimura 1996; Zhao ve ark. 2001; Liu ve ark. 2012; Vitvitsky ve ark. 2012). NaHS aköz solüsyonlarda $[HS^-]$ ve $[Na^+]$ iyonlarına ayrışmakta ve ardından $[HS^-]$ su ile reaksiyona girerek H_2S 'i meydana getirmektedir. Al-Magablech ve Hart'ın polarografik sensörler kullanarak yaptıkları ölçümler, NaHS'in Krebs solüsyonunda (37 $^{\circ}C$) çözündüğünde % 10'dan daha az bir kısmının serbest H_2S şeklinde bulunduğunu göstermiştir. Deneylerimizde kullanılan Krebs solüsyonunun sıcaklığı (37 $^{\circ}C$) göz önüne alındığında, NaHS'in maksimum gevşetici etkisinin görüldüğü konsantrasyon olan 3mM, H_2S 'in fizyolojik düzeyleri ile karşılaştırılabilir seviyededir. In vitro çalışmalarda H_2S 'in 1 μM -10 mM gibi geniş bir aralıkta uygulandığı görülmektedir (Cheng ve ark. 2004; Cheang ve ark. 2010; Al-Magablech ve Hart 2011). Çalışmamızda H_2S 'in daha düşük konsantrasyonlarının etkisinin değerlendirilmesi amacıyla NaHS' 1nM-3mM arasındaki konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

Sonuç olarak, bulgularımız önceden kastırılmış izole insan safen veninde H_2S 'in düşük konsantrasyonlarında herhangi bir kasılma cevabına neden olmadığını yüksek konsantrasyonlarda gevşetici etki gösterdiğini ve söz konusu gevşetici etkiye NO ve K_{ATP} kanallarının aracılık ettiğini ortaya koymaktadır. Kaveola deplesyonu yapılmış izole insan safen venlerinde H_2S donörü NaHS'in gevşetici etkilerinin azalması, sinyal transdüksiyonunda önemli rol oynayan çeşitli proteinlerin ve iyon kanallarının (Örn. K_{ATP} kanalları) lokalize olduğu ve sinyal üretim merkezi olarak kabul edilen kaveolar yapının bütünlüğünün H_2S cevaplarında rolü olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın bundan sonraki kısmında kaveolar yapı bütünlüğü- H_2S cevapları arasındaki ilişkiye

aracılık eden mekanizmaların daha detaylı incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla izole insan safen venlerinde CSE enzim ekspresyonlarının ve aktivitesinin değerlendirilmesi, CSE enziminin kaveolar yapıdaki lokalizasyonun ve kaveolanın ana proteini olan kaveolin-1 ile etkileşiminin etkisinin endoteli uzaklaştırılmış izole safen venlerinde araştırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Abe, K. ve Kimura, H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience*, **16**, 1066-1071.

Ali, M. Y., Whiteman, M., Low, C. M., ve Moore, P. K. (2007). Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATP channel-dependent pathway. *Journal of Endocrinology*, **195**, 105-112.

Ali, M.Y., Ping, C.Y., Mok Y.Y., Ling, L., Whiteman, M., Bhatia, M. ve ark. (2006). Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide?. *Britisch Journal of Pharmacology*, **149**, 625-634.

Al-Magableh, M. R., ve 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.

Aravamudan, B., Volonte, D., Ramani, R., Gursoy, E., Lisanti, M. P., London, B. ve ark. (2003). Transgenic overexpression of caveolin-3 in the heart induces a cardiomyopathic phenotype. *Human molecular genetics*, **12**, 2777-2788.

Atger, V. M., de la Llera Moya, M., Stoudt, G. W., Rodriguez, W. V., Phillips, M. C., ve Rothblat, G. H. (1997). Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *Journal of Clinical Investigation*, **99(4)**, 773.

Augustus, A. S., Buchanan, J., Gutman, E., Rengo, G., Pestell, R. G., Fortina, P. ve ark. (2008). Hearts lacking caveolin-1 develop hypertrophy with normal cardiac substrate metabolism. *Cell cycle*, **7**, 2509-2518.

Bastiani, M. ve Parton, R. G. (2010). Caveolae at a glance. *Journal of Cell Science*, **123**, 3831-3836.

Bastiani, M., Liu, L., Hill, M. M., Jedrychowski, M. P., Nixon, S. J., Lo, H. P. ve ark. (2009). MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *The Journal of cell biology*, **185**, 1259-1273.

Bauer, C.C., Boyle, J.P., Portre, K.E. ve Peers, C. (2010). Modulation of Ca^{2+} signalling in human vascular endothelial cells by hydrogen sulfide. *Atherosclerosis*, **209**, 374-380.

Berridge, M. J. (2012). Cell Signalling Biology; doi: 10.1042/csb0001006

Blair, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Conrad, P. A. ve Smart, E. J. (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 32512-32519.

Brouet, A., DeWever, J., Martinive, P., Havaux, X., Bouzin, C., Sonveaux, P. ve ark. (2005). Antitumor effects of in vivo caveolin gene delivery are associated with the inhibition of the proangiogenic and vasodilatory effects of nitric oxide. *The FASEB journal*, **19**, 602-604.

Bucci, M., Gratton, J. P., Rudic, R. D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G. ve ark. (2000). In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nature medicine*, **6**, 1362-1367.

Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C. ve ark. (2010). Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Inhibitor of Phosphodiesterase Activity. *Journal of the American Heart Association*, **30**, 1998-2004.

Cai W.J., Wang, M.J., Moore, P.K., Jin, H.M., Yao, T. ve Zhu, Y.C. (2007) The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovascular research*, **76**, 29-40.

Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A. ve Stella, A. M. G. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, **8**, 766-775.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, **6**, 389-396.

Chang, S. H., Feng, D., Nagy, J. A., Sciuto, T. E., Dvorak, A. M. ve Dvorak, H. F. (2009). Vascular permeability and pathological angiogenesis in caveolin-1-null mice. *The American journal of pathology*, **175**, 1768-1776.

Cheang, W.S., Wong, W.T., Shen, B., Lau, C.W., Tian, X.Y., Tsang, S.Y. ve ark. (2010). 4-Aminopyridine-sensitive K⁺ channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery. *Elsevier*, **53**, 94-98.

Chen, Y. H., Yao, W. Z., Geng, B., Ding, Y. L., Lu, M., Zhao, M. W. ve ark. (2005). Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest Journal*, **128**, 3205-3211.

Cheng, Y., Ndisang, J.F., Tang, G., Cao, K. ve Wang, R. (2004). Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal Physiology Heart Circulation Physiology*, **287**, 2316-2323.

Chidlow, J. H. ve Sessa, W. C. (2010). Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovascular research*, **86**, 219-225.

Chitnis, M. K., Njie-Mbye, Y. F., Opere, C. A., Wood, M. E., Whiteman, M., ve Ohia, S. E. (2013). Pharmacological actions of the slow release hydrogen sulfide donor GYY4137 on phenylephrine-induced tone in isolated bovine ciliary artery. *Experimental eye research*, **116**, 350-354.

Cohen, A. W., Park, D. S., Woodman, S. E., Williams, T. M., Chandra, M., Shirani, J. ve ark. (2003). Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **284**, 457-474.

Darblade, B., Caillaud, D., Poirot, M., Fouque, M. J., Thiers, J. C., Rami, J., ve ark. (2001). Alteration of plasmalemmal caveolae mimics endothelial dysfunction observed in atheromatous rabbit aorta. *Cardiovascular research*, **50(3)**, 566-576.

Desjardins, F., Lobysheva, I., Pelat, M., Gallez, B., Feron, O., Dessy, C. ve ark. (2008). Control of blood pressure variability in caveolin-1-deficient mice: role of nitric oxide identified in vivo through spectral analysis. *Cardiovascular research*, **79**, 527-536.

Dessy, C., Feron, O., Balligand, J. L. (2010). The regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolin: a paradigm validated in vivo and shared by the 'endothelium-derived hyperpolarizing factor'. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **459**, 817-827.

di Villa Bianca, R. D. E., Sorrentino, R., Maffia, P., Mirone, V., Imbimbo, C. ve Fusco, F. (2009). Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(11), 4513-4518.

Dombkowski, R. A., Russell, M. J., Schulman, A. A., Doellman, M. M. ve Olson, K. R. (2005). Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **288**, R243-R252.

Dominy, J. E., ve Stipanuk, M. H. (2004). New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H₂S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant. *Nutrition reviews*, **62**, 348-353.

Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B. ve ark. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, **293**, 2449-2452.

Dreja, K., Voldstedlund, M., Vinten, J., Trandum-Jensen, J., Hellstrand, P., ve Swärd, K. (2002). Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **22**(8), 1267-1272.

Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 15560-15565.

Fernández-Hernando, C., Yu, J., Suárez, Y., Rahner, C., Dávalos, A., Lasunción, M. A. ve ark (2009). Genetic evidence supporting a critical role of endothelial caveolin-1 during the progression of atherosclerosis. *Cell metabolism*, **10**, 48-54.

Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A. ve Michel, T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 22810-22814.

Fiorucci, S., Antonelli, E., Mencarelli, A., Orlandi, S., Renga, B., Rizzo, G. ve ark. (2005). The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology*, **42**, 539-548.

Frank, P. G., Lee, H., Park, D. S., Tandon, N. N., Scherer, P. E. ve Lisanti, M. P. (2004). Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **24**, 98-105.

Fujita, A., Kurachi, Y. (2000). Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacology & therapeutics*, **85**, 39-53.

Furne, J., Saeed, A., ve 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**, 1479-1485.

Galkina, E. ve Ley, K. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual review of immunology*, **27**, 165.

García-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B. S. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S. ve ark. (1997). Dissecting the Interaction between Nitric Oxide Synthase (NOS) and Caveolin functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 25437-25440.

Geng, B., Cui, Y., Zhao, J., Yu, F., Zhu, Y. ve Xu, G. (2007). Hydrogen sulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **293**, 1608-1618.

Geng, B., Yang, J., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., Du, J., ve Tang, C. (2004). H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochemical and biophysical research communications*, **313**(2), 362-368.

Gratton, J. P., Bernatchez, P. ve Sessa, W. C. (2004). Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circulation research*, **94**, 1408-1417.

Hansen, C. G. ve Nichols, B. J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends in cell biology*, **20**, 177-186.

Hausenloy, D. J., Tsang, A. ve Yellon, D. M. (2005). The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends in cardiovascular medicine*, **15**, 69-75.

Hayer, A., Stoeber, M., Bissig, C., ve Helenius, A. (2010). Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*, **11**(3), 361-382.

Hill, M. M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S. ve ark. (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*, **132**, 113-124.

Horikawa, Y. T., Patel, H. H., Tsutsumi, Y. M., Jennings, M. M., Kidd, M. W., Hagiwara, Y. ve ark. (2008). Caveolin-3 expression and caveolae are required for isoflurane-induced cardiac protection from hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **44**, 123-130.

Hosoki, R., Matsuki, N., ve Kimura, H. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications*, **237**, 527-531.

Hu, L. F., Wong, P. T. H., Moore, P. K., ve Bian, J. S. (2007). Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *Journal of neurochemistry*, **100**, 1121-1128.

Hu, Y., Chen, X., Pan, T. T., Neo, K. L., Lee, S. W., Khin, E. S. W. (2008). Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **455**, 607-616.

Ishigami, M., Hiraki, K., Umemura, K., Ogasawara, Y., Ishii, K. ve Kimura, H. (2009). A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxidants & redox signaling*, **11**, 205-214.

Jackson-Weaver, O., Osmond, J. M., Riddle, M. A., Naik, J. S., Bosc, L. V. G. ve Walker, B. R. (2013). Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and smooth muscle Ca²⁺

sparks. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **304**, 1446-1454.

Jackson-Weaver, O., Paredes, D. A., Bosc, L. V. G., Walker, B. R. ve 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**, 1439-1447.

Jiang, B., Tang, G., Cao, K., Wu, L. ve Wang, R. (2010). Molecular mechanism for H₂S-induced activation of KATP channels. *Antioxidants & redox signaling*, **12**, 1167-1178.

Jiao, J., Garg, V., Yang, B., Elton, T.S. ve Hu, K. (2008). Protein kinase C-epsilon induces caveolin-dependent internalization of vascular adenosine 5'-triphosphate-sensitive K^{+} channels. *Hypertension*, **52(3)**, 499-506.

Johansen, D., Ytrehus, K., ve Baxter, G. F. (2006). Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia–reperfusion injury. *Basic research in cardiology*, **101(1)**, 53-60.

Ju, H., Zou, R., Venema, V. J. ve Venema, R. C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 18522-18525.

Jung, N. H., Kim, H. P., Kim, B. R., Cha, S. H., Kim, G. A., Ha, H., .ve ark. (2003). Evidence for Heme Oxygenase-1 Association with Caveolin-1 and-2 in Mouse Mesangial Cells. *IUBMB life*, **55**, 525-532.

Kaneko, Y., Kimura, T., Taniguchi, S., Souma, M., Kojima, Y., Kimura, Y.,ve ark. (2009). Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS letters*, **583(2)**, 377-382.

Kaneko, Y., Kimura, Y., Kimura, H., ve Niki I. (2006). Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *Diabetes*, **55**, 1391-1397.

Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., ve ark. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *Journal of Biological Chemistry*, **270(29)**, 17250-17256.

Kim, H. P., Wang, X., Galbiati, F., Ryter, S.W., Choi, A.M. (2004). Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J.*2004; **18**, 1080-1089.

Kimura, H. (2013). Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochemistry international*, **63**, 492-497.

Kimura, Y., Goto, Y. I. ve Kimura, H. (2010). Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants & redox signaling*, **12**, 1-13.

Kiss, L., Deitch, E. A., ve Szabó, C. (2008). Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. *Life sciences*, **83**, 589-594.

Klein, U., Gimpl, G., ve Fahrenholz, F. (1995). Alteration of the Myometrial Plasma Membrane Cholesterol Content with. beta.-Cyclodextrin Modulates the Binding Affinity of the Oxytocin Receptor. *Biochemistry*, **34(42)**, 13784-13793.

Krajewska, W. M. ve Maslowska, I. (2004). Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cellular And Molecular Biology Letters*, **9**, 195-220.

Kubo, S., Doe, I., Kurokawa, Y., Nishikawa, H., ve Kawabata, A. (2007a). Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology*, **232**, 138-146.

Kubo, S., Kurokawa, Y., Doe, I., Masuko, T., Sekiguchi, F., ve Kawabata, A. (2007b). Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology*, **241(1)**, 92-97.

Le Lay, S. ve Kurzchalia, T. V. (2005). Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1746**, 322-333.

Lee, S. W., Cheng, Y., Moore, P. K. ve Bian, J. S. (2007). Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **358**, 1142-1147.

Leventis, R., ve Silviu, J. R. (2001). Use of cyclodextrins to monitor transbilayer movement and differential lipid affinities of cholesterol. *Biophysical journal*, **81**(4), 2257-2267.

Levitan, I., Christian, A. E., Tulenko, T. N., ve Rothblat, G. H. (2000). Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. *The Journal of general physiology*, **115**(4), 405-416.

Levitt, M. D., Abdel-Rehim, M. S. ve 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**, 373-378

Li, L., Bhatia, M., ve Moore, P. K. (2006). Hydrogen sulphide—a novel mediator of inflammation?. *Current opinion in pharmacology*, **6**, 125-129.

Lim, J. J., Liu, Y. H., Khin, E. S. W. ve Bian, J. S. (2008). Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **295**, 1261-1270.

Lin, M. I., Yu, J., Murata, T. ve Sessa, W. C. (2007). Caveolin-1–Deficient Mice Have Increased Tumor Microvascular Permeability, Angiogenesis, and Growth. *Cancer Research*, **67**, 2849-2856.

Linder, A. E., McCluskey, L. P., Cole, K. R., Lanning, K. M., ve Webb, R. C. (2005). Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **314**(1), 9-15.

Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H. ve ark. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *The Journal of cell biology*, **126**, 111-126.

Liu, J., Wang, X. B., Park, D. S. ve Lisanti, M. P. (2002). Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 10661-10668.

Liu, L., Brown, D., McKee, M., LeBrasseur, N. K., Yang, D., Albrecht, K. H. ve ark. (2008). Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell metabolism*, **8**, 310-317.

Liu, Y. H., Lu, M., Hu, L. F., Wong, P. T. H., Webb, G. D. ve Bian, J. S. (2012). Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxidants & redox signaling*, **17**, 141-185.

Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M. ve Järvinen, T. (2005). Cyclodextrins in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, **2**, 335-351.

Lungu, A. O., Jin, Z. G., Yamawaki, H., Tanimoto, T., Wong, C. ve Berk, B. C. (2004). Cyclosporin A inhibits flow-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase by altering cholesterol content in caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 48794-48800.

Mani, S., Li, H., Untereiner, A., Wu, L., Yang, G., Austin, R. C. ve ark. (2013). Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation*, **127**, 2523-2534.

Martelli, A., Testai, L., Breschi, M. C., Blandizzi, C., Viridis, A. ve Taddei, S. (2012). Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery. *Medicinal research reviews*, **32(6)**, 1093-1130.

Martelli, A., Testai, L., Breschi, M. C., Lawson, K., McKay, N. G., Miceli, F. ve ark. (2013). Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacological Research*, **70**, 27-34.

Meng, J., Adaikan, P. G., ve Srilatha, B. (2012). Hydrogen sulfide promotes nitric oxide production in corpus cavernosum by enhancing expression of endothelial nitric oxide synthase. *International journal of impotence research*, **25(3)**, 86-90.

Meng, Q. H., Yang, G., Yang, W., Jiang, B., Wu, L. ve Wang, R. (2007). Protective effect of hydrogen sulfide on balloon injury-induced neointima hyperplasia in rat carotid arteries. *The American journal of pathology*, **170**, 1406-1414.

Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Yamada, M. ve Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca²⁺ influx. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 39379-39386.

Mikami, Y., Shibuya, N., Ogasawara, Y. ve Kimura, H. (2013). Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ -lyase at the steady-state low intracellular Ca^{2+} concentrations. *Biochemical and biophysical research communications*, **431**, 131-135.

Minamishima, S., Bougaki, M., Sips, P. Y., De Yu, J., Minamishima, Y. A., Elrod, J. W. ve ark. (2009). Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation*, **120**, 888-896.

Murata, T., Lin, M. I., Huang, Y., Yu, J., Bauer, P. M., Giordano, F. J. ve ark. (2007). Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *The Journal of experimental medicine*, **204**, 2373-2382.

Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K. ve ark. (2011). Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulphydrates potassium channels. *Circulation research*, **109**, 1259-1268.

Ogata, T., Ueyama, T., Isodono, K., Tagawa, M., Takehara, N., Kawashima, T. ve ark. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Molecular and cellular biology*, **28**, 3424-3436.

Oh, G. S., Pae, H. O., Lee, B. S., Kim, B. N., Kim, J. M., Kim, H. R. ve ark. (2006). Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264. 7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine*, **41**, 106-119.

Ohvo, H., ve Slotte, J. P. (1996). Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochemistry*, **35(24)**, 8018-8024.

Palade, G. E. (1961). Blood capillaries of the heart and other organs. *Circulation*, **24**, 368-384.

Pani, B. ve Singh, B. B. (2009). Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell calcium*, **45**, 625-633.

Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z. ve ark. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 21972-21977.

Park, D. S., Woodman, S. E., Schubert, W., Cohen, A. W., Frank, P. G., Chandra, M. ve ark. (2002). Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *The American journal of pathology*, **160**, 2207-2217.

Park, H., Go, Y. M., John, P. L. S., Maland, M. C., Lisanti, M. P., Abrahamson, D. R. ve ark. (1998). Plasma membrane cholesterol is a key molecule in shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 32304-32311.

Parton, R. G. ve del Pozo, M. A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*, **14**, 98-112.

Patel, H. H., Head, B. P., Petersen, H. N., Niesman, I. R., Huang, D., Gross, G. J. ve ark. (2006). Protection of adult rat cardiac myocytes from ischemic cell death: role of caveolar microdomains and δ -opioid receptors. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **291**, 344-350.

Prockop, L. D. ve Chichkova, R. I. (2007). Carbon monoxide intoxication: an updated review. *Journal of the neurological sciences*, **262**, 122-130.

Puranik, M., Weeks, C. L., Lahaye, D., Kabil, Ö., Taoka, S., Nielsen, S. B. ve ark. (2006). Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine β -synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 13433-13438.

Pyriochou, A., Szabó, C. ve Papapetropoulos, A. (2007). IK-1001, a hydrogen sulfide donor stimulates angiogenesis. *Free Radicals in Montevideo Meeting, Montevideo Sept 2–6 Book of Abstracts*. 49.

Qingyou, Z., Junbao, D., Weijin, Z., Hui, Y., Chaoshu, T. ve Chunyu, Z. (2004). Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension. *Biochemical and biophysical research communications*, **317**, 30-37.

Rahman, A. ve Swärd, K. (2009). The role of caveolin-1 in cardiovascular regulation. *Acta Physiologica*, **195**, 231-245.

Rath, G., Dessy, C. ve Feron, O. (2009). Caveolae, caveolin and control of vascular tone: nitric oxide (NO) and endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) regulation. *J Physiol Pharmacol*, **60**, 105-109.

Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B. ve ark. (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 38121-38138.

Razani, B., ve Lisanti, M. P. (2001). Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *The Journal of clinical investigation*, **108**, 1553-1561.

Reeves, V. L., Thomas, C. M. ve Smart, E. J. (2012). Lipid rafts, caveolae and GPI-linked proteins. İçinde J.F. Jasmin, P. G. Frank, M. P. Lisanti (Ed), *Caveolins and Caveolae: Roles in Signalling and Disease Mechanisms*. Springer US; 3-13

Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., ve Roth, S. H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **32**, 109-134.

Rinaldi, L., Gobbi, G., Pambianco, M., Micheloni, C., Mirandola, P. ve Vitale, M. (2006). Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Laboratory investigation*, **86**, 391-397.

Rizzo, V., McIntosh, D. P., Oh, P. ve Schnitzer, J. E. (1998a). In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 34724-34729.

Rizzo, V., Sung, A., Oh, P. ve Schnitzer, J. E. (1998b). Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 26323-26329.

Saliez, J., Bouzin, C., Rath, G., Ghisdal, P., Desjardins, F., Rezzani, R. ve ark. (2008). Role of Caveolar Compartmentation in Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Relaxation Ca²⁺ Signals and Gap Junction Function Are Regulated by Caveolin in Endothelial Cells. *Circulation*, **117**, 1065-1074.

Sampson, L. J., Davies, L. M., Barrett-Jolley, R., Standen, N. B., ve Dart, C. (2007). Angiotensin II-activated protein kinase C targets caveolae to inhibit aortic ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovascular research*, **76**(1), 61-70.

Schleifenbaum, J., Köhn, C., Voblova, N., Dubrovskaya, G., Zavarirskaya, O., Gloe, T. ve ark. (2010). Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *Journal of hypertension*, **28**, 1875-1882.

Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E., ve Allard, J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of cell biology*, **127**(5), 1217-1232.

Schubert, W., Frank, P. G., Razani, B., Park, D. S., Chow, C. W. ve Lisanti, M. P. (2001). Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 48619-48622.

Sheets, E. D., Holowka, D. ve Baird, B. (1999). Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcεRI and their association with detergent resistant-membranes. *The journal of cell biology*, **145**(4), 877-887.

Shibuya, N. ve Kimura, H. (2013). Production of hydrogen sulfide from D-cysteine and its therapeutic potential. *Frontiers in endocrinology*, **4**.

Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y. ve Ogasawara, Y. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Communications*, **4**, 1366.

Simons, K. ve Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.

Simons, K. ve van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**, 6197-6202.

Skovgaard, N., Gouliaev, A., Aalling, M., ve Simonsen, U. (2011). The role of endogenous H₂S in cardiovascular physiology. *Current pharmaceutical biotechnology*, **12**(9), 1385-1393.

Sowa, G. (2012). Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. *Frontiers in physiology*, **2**.

Sowa, G., Pypaert, M. ve Sessa, W. C. (2001). Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 14072-14077.

Srilatha, B., Adaikan, P. G., Li, L. ve Moore, P. K. (2007). Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *The journal of sexual medicine*, **4**, 1304-1311.

Stecyk, J. A., Skovgaard, N., Nilsson, G. E. ve Wang, T. (2010). Vasoactivity of hydrogen sulfide in normoxic and anoxic turtles (*Trachemys scripta*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **298**, 1225-1239.

Streeter, E., Hart, J., ve Badoer, E. (2012). An investigation of the mechanisms of hydrogen sulfide-induced vasorelaxation in rat middle cerebral arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, **385** (10), 991-1002.

Sun, R., Muller, S., Stoltz, J. ve Wang, X. (2002). Shear stress induces caveolin-1 translocation in cultured endothelial cells. *European Biophysics Journal*, **30**, 605-611.

Szabó, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews Drug discovery*, **6**, 917-935.

Tagawa, M., Ueyama, T., Ogata, T., Takehara, N., Nakajima, N., Isodono, K. ve ark. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **295**, 490-498.

Tahir, S. A., Yang, G., Goltsov, A. A., Watanabe, M., Tabata, K. I., Addai, J. ve ark. (2008). Tumor Cell–Secreted Caveolin-1 Has Proangiogenic Activities in Prostate Cancer. *Cancer Research*, **68**, 731-739.

Taira, J., Sugishima, M., Kida, Y., Oda, E., Noguchi, M., Higashimoto, Y. (2011). Caveolin-1 is a competitive inhibitor of heme oxygenase-1 (HO-1) with heme: identification of a minimum sequence in caveolin-1 for binding to HO-1. *Biochemistry*, **50**, 6824-6831.

Tang, G., Wu, L., Liang, W. ve Wang, R. (2005). Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology*, **68**, 1757-1764.

Tang, G., Zhang, L., Yang, G., Wu, L., ve Wang, R. (2013). Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca^{2+} channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*, **56**(3), 533-541.

Tarnawski, A. S. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive diseases and sciences*, **50**, S24-S33.

Thomas, C. M. ve Smart, E. J. (2008). Caveolae structure and function. *Journal of cellular and molecular medicine*, **12**, 796-809.

Tian, X. Y., Wong, W. T., Sayed, N., Luo, J., Tsang, S. Y., Bian, Z. X. ve ark (2012). NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of l-type voltage-sensitive Ca^{2+} channel. *Pharmacological Research*, **65**(2), 239-246.

Tsutsumi, Y. M., Horikawa, Y. T., Jennings, M. M., Kidd, M. W., Niesman, I. R., Yokoyama, U. ve ark. (2008). Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 induces endogenous cardiac protection by mimicking ischemic preconditioning. *Circulation*, **118**, 1979-1988.

Vitvitsky, V., Kabil, O., ve Banerjee, R. (2012). High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations. *Antioxidants & redox signaling*, **17**(1), 22-31.

Wallace, J. L., Dickey, M., McKnight, W. ve Martin, G. R. (2007). Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *The FASEB Journal*, **21**, 4070-4076.

Wang, R. U. I. (2002). Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB Journal*, **16**, 1792-1798.

Wang, Y. F., Mainali, P., Tang, C. S., Shi, L., Zhang, C. Y., Yan, H. ve ark. (2008). Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chinese Medical Journal*, **121**, 420.

Wang, Y., Zhao, X., Jin, H., Wei, H., Li, W., Bu, D. ve ark. (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.

Webb, G. D., Lim, L. H., Oh, V. M., Yeo, S. B., Cheong, Y. P., Ali, M. Y. ve ark. (2008). Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its

biosynthesis in the human internal mammary artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **324**, 876-882.

Woodman, S. E., Ashton, A. W., Schubert, W., Lee, H., Williams, T. M., Medina, F. A. ve ark. (2003). Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *The American journal of pathology*, **162**, 2059-2068.

Woodman, S. E., Park, D. S., Cohen, A. W., Cheung, M. W. C., Chandra, M., Shirani, J., ve Lisanti, M. P. (2002). Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *Journal of Biological Chemistry*, **277(41)**, 38988-38997.

Wu, L., Yang, W., Jia, X., Yang, G., Duridanova, D., Cao, K., ve ark. (2008). Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Laboratory Investigation*, **89(1)**, 59-67.

Xu, Y., Henning, R. H., van der Want, J. J. L., van Buiten, A., van Gilst, W. H., ve Buikema, H. (2007). Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO-as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. *Life sciences*, **80(18)**, 1678-1685.

Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, **1**, 445.

Yang, G., Sun, X. ve Wang, R. (2004). Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *The FASEB journal*, **18**, 1782-1784.

Yang, G., Wu, L. ve Wang, R. (2006). Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells. *The FASEB journal*, **20**, 553-555.

Yang, G., Yang, W., Wu, L. ve Wang, R. (2007). H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *The journal of biological chemistry*, **282**, 16567-16576

Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L. ve Wang, R. (2005). Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of physiology*, **569**, 519-531.

Yong, Q. C., Lee, S. W., Foo, C. S., Neo, K. L., Chen, X. ve Bian, J. S. (2008). Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **295**, 1330-1340.

Yu, J., Bergaya, S., Murata, T., Alp, I. F., Bauer, M. P., Lin, M. I., ve ark. (2006). Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *Journal of Clinical Investigation*, **116**, 1284-1291.

Zhang, H., Guo, C., Wu, D., Zhang, A., Gu, T., Wang, L. ve ark. (2012). Hydrogen sulfide inhibits the development of atherosclerosis with suppressing CX3CR1 and CX3CL1 expression. *PloS one*, **7**, e41147.

Zhao, W. ve Wang, R. (2002). H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **283**, 474-480.

Zhao, W., Ndisang, J. F. ve Wang, R. (2003). Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **81**, 848-853.

Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y. ve Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO journal*, **20**, 6008-6016.

Zhao, Y. Y., Zhao, Y. D., Mirza, M. K., Huang, J. H., Potula, H. H. S., Vogel, S. M. ve ark. (2009). Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. *The Journal of clinical investigation*, **119**.

ETİK KURUL KARARI

~~Tarih: 14 Ocak 2014~~
 Sayı: B.08.06.70K.2.İ.Ü.C.50.0.05.00/01

İ.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü Müdürlüğüne

İLGİ: 15.07.2009 tarihli, 1797 sayılı yazınıza:

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında görevli olan Ecz. Selin Yamakoğlu'nun sorumluluğunda "Kaveola ve Kaveolinlerin İzole İnsan Safen Veninde Hidrojensülfür (H₂S) ile Gözlenen Gevşeme Yanıtlarındaki Rolü" konulu çalışmasının etik değerlendirme onayı hakkındaki yazı ve ekleri 08.Ocak.2014 tarihinde toplanan Enstitümüz Etik Komisyonunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen Anabilim Dalı Başkanlığınabildirilmesini saygılarımla arz ederim.

EKİ: --

1 dosya

Etik Değerlendirme Komisyon Başkanı

Doç. Dr. Ayşem Kaya

Prof. Dr.
 EYİA ADEMOĞLU

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Selin	Soyadı	Yamakoğlu
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	20/10/1989
Uyruğu	TC	TC Kim No	61342225612
Email	selinyamakoglu@hotmail.com	Tel	0 533 136 18 60

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2012
Lise	Adnan Menderes Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Staj	İ.E.Ulagay	3 ay(2006-2007)
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	60	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	86.9154		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

- İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2013
- TÜBİTAK-BİDEB Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu, 2012-2013