



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Fare mide fundus dokusunda L-sistein/H₂S yolağının KCl kasılma yanıtları üzerindeki etkisine nitrik oksid ve siklooksijenaz yolağının olası katkısı

The possible contribution of NO and cyclooxygenase pathways to the effect of L-cysteine/H₂S pathway on the contractile response of KCl in mouse gastric fundus

Fatma Aydınoglu¹

¹Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Adana, Turkey
Cukurova Medical Journal 2018;43(2):276-285

Abstract

Purpose: The aim of present study, was to investigate the effect of L-cysteine/ hydrogen sulfide (H₂S) pathway on contractile response to potassium chloride in mouse gastric fundus and possible contributions of nitric oxide (NO) and cyclooxygenase (COX) pathways in this effect

Material and Methods: The contractile responses to cumulative KCl was produced in isolated mouse fundus strips and the effect of L-cysteine (10 mM) on this responses was examined. In addition, the effect of L-cysteine on the contractile responses to KCl were investigated in the presence cystathionine beta-synthase (CBS) enzyme inhibitor aminoxycetic acid (AOAA; 1 mM) and cystathionine gamma-lyase (CSE) enzyme inhibitor propargyl glycine (PAG, 10 mM), which mediated the endogenously synthesize of H₂S. The possible contribution of NO and COX pathways to the effect of L-cysteine on KCl contractions was examined in the presence of L-Nitroarginine (L-NA; 0.1 mM), a nitric oxide synthase inhibitor and indomethacin (0.001 M), a non-selective COX inhibitor.

Results: The inhibitory effect of L-cysteine on contractile response was significantly reversed by AOAA. However, PAG reduced the inhibitory effect of L-cysteine on the contractile responses to lower concentrations KCl. In the presence of L-NA, L-cysteine decreased the maximum contractile response to KCl and this inhibitory effect was reversed by AOAA and PAG. The inhibitory effect of L-cysteine on the contractile response to lower concentration of KCl was reversed with indomethacin.

Conclusion: The findings of current study suggest that L-cystein/H₂S pathway has an inhibitory effect on the contractile response to KCl and this effect may be related NO and COX pathways.

Key words: Cyclooxygenase, fundus, L-cysteine

Öz

Amaç: Çalışmamızda, fare mide fundus dokusunda L-sistein/hidrojen sülfür (H₂S) yolağının potasyum klorür (KCl) kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ve bu etkide nitrik oksid (NO) ve siklooksijenaz (COX) yollarının olası katkılarının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İzole fare fundus şeritlerinde, kümülatif KCl (10-80 mM) ile kasılma yanıtları oluşturulup, L-sistein (10 mM)'in bu kasılma yanıtları üzerindeki etkisi incelendi. Ayrıca, H₂S'in endojen olarak sentezine aracılık eden sistasyon beta-sentaz (CBS) enzim inhibitörü aminooksiasetik asid (AOAA; 1 mM) ve sistasyon gamma-lyaz (CSE) enzim inhibitörü propargil glisin (PAG, 10 mM) varlığında, L-sistein'in KCl kasılma yanıtları üzerindeki etkisi araştırıldı. L-sistein'in KCl kasılmaları üzerindeki etkisine NO ve COX yollarının olası katkısı, nitrik oksid sentaz (NOS) enzim inhibitörü L-Nitroarjinin (L-NA; 0.1 mM) ve non-selektif COX enzim inhibitörü indometazin (0.001 mM) varlığında incelendi.

Bulgular: AOAA, L-sistein'in KCl kasılmaları üzerindeki inhibe edici etkisinin geri çevrilmesine neden oldu. PAG varlığında ise, L-sistein'in düşük konsantrasyonlardaki KCl kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisinin azaldığı gözlemlendi. L-NA içeren ortamda, L-sistein sadece maksimum KCl kasılma yanıtında bir inhibisyona neden oldu. Bu inhibe edici etki, AOAA ve PAG ile geri çevrildi. İndometazin ise, L-sistein'in KCl kasılmaları üzerindeki düşük konsantrasyondaki inhibe edici etkisinin azalmasına neden oldu.

Sonuç: Bu bulgular, fare fundus dokusunda L-sistein/H₂S yolağının KCl kasılma yanıtları üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu ve bu etkinin NO ve COX yolları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Pfundus, L-sistein, siklooksijenaz

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Fatma Aydınoglu, Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı Adana, Turkey. E-mail: faydinoglu@cu.edu.tr
Geliş tarihi/Received: 13.06.2017 Kabul tarihi/Accepted: 19.09.2017

GİRİŞ

Hidrojen sülfür (H_2S) gaz bir nörotransmitter olup, memelilerde endojen olarak L-sistein ve homosistein'den transsülfürasyon ile sentezlenmektedir. L-sistein'in, endojen H_2S sentezinden sorumlu ana substrat olduğu ve H_2S sentezinin öncelikli olarak L-sistein'den sitoplazmik piridoksal 5'-fosfat enzimleri olan sistation beta-sentaz (CBS) ve sistation-gammaliyaz (CSE) enzimleri aracılığıyla sentezlendiği bildirilmiştir¹. İlave olarak, 3-merkaptopürivat sülfürtransferaz (3-MST) enziminin, α -ketoglutarat varlığında sistein veya D-sistein'den sistein aminotransferaz enzimi aracılığıyla H_2S sentezinden sorumlu üçüncü enzim olduğu gösterilmiştir^{2,3}.

H_2S 'in damar dokusu, karaciğer, böbrek, akciğer, gastrointestinal sistem, sinir sistemi, üreme organları, iskelet kası ve adipoz doku gibi birçok dokuda enzimatik olarak sentezlendiği belirlenmiştir⁴⁻¹⁰. Gastrointestinal yapıda, CBS ve CSE enzimleri eksprese edilmiş ve H_2S 'in yüksek miktarda bulunduğu rapor edilmiştir¹¹⁻¹³. H_2S donörü olan sodyum hidrojen sülfür (NaHS)'ün, farklı türlere ait mide fundus, ileum ve distal kolon dokularında konsantrasyona bağlı olarak gevşeme yanıtının oluşturduğu gözlemlenmiştir^{5, 11,14,15}. Ayrıca, NaHS'in izole fare, jejunum ve kolon preparatlarında spontan motor kompleksi, insan ve sıçan kolon preparatlarında spontan motiliteyi konsantrasyona-bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir¹². H_2S 'in gastrointestinal motilitenin regülasyonunda inhibitör role sahip olduğu ileri sürülmüştür¹¹⁻¹³. Ancak, H_2S 'in gastrointestinal motilite üzerindeki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Besin alımı sırasında mide fundus'unda gerçekleşen adaptif ve reseptif gevşemeler gastrik akodomasyona olanak sağlar¹⁶. Gastrointestinal yapıdaki inhibitör non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) sinirlerden salıverilen nitrik oksid (NO), bu gevşemelerden sorumlu esas nörotransmitterdir^{17,18}. Bu nedenle çalışmamızda, L-sistein/ H_2S yolağının mide fundus dokusunda KCl kasılma yanıtları üzerindeki etkisinde NO'nun rolü araştırıldı. Ayrıca, fare korpus kavernozum¹⁹ ve kobay mesane²⁰ düz kaslarında, ekzojen H_2S ile oluşan gevşeme yanıtlarında siklooksijenaz yolağının olası rolü olduğu gösterilmiştir. Ancak, Di Villa Bianca ve arkadaşları (2011), tarafından sıçan mezenterik arter dokusunda ekzojen H_2S yanıtlarının COX yolağından bağımsız olduğu ileri sürülmüştür²¹. Bu

çalışmada, L-sistein/ H_2S yolağının KCl aracılı kasılma yanıtları üzerindeki etkisi ve bu etkide nitrik oksid (NO) ve siklooksijenaz (COX) yolaklarının olası katkısının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneylerde Ç.Ü. Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden (DETAUM) sağlanan 20-25 g ağırlığında Swiss albino türü her iki cinsiyetten beyaz fareler kullanıldı. Deneylere alınacak hayvanlar oda sıcaklığı 20 ± 0.5 °C olan ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılması yapılan ortamda barındırıldı. Ç.Ü. DETAUM'dan (Etik kurul onay tarihi: 22.10.2015 karar no:8) deneylerin gerçekleştirilmesi için yerel etik kurul onayı alınmıştır.

İn vitro çalışmalar

Fareler servikal dislokasyon ile öldürüldü. Mideler dikkatlice çıkarılıp Tyrode solüsyonu içeren petri kutusunda midenin fundus kısmı izole edildi. Her bir fundus dokusundan yaklaşık 5 mm uzunluğunda ve 2 mm eninde uzunlamasına iki ayrı strip halinde preparatlar elde edildi. Her iki strip %95 O_2 ve %5 CO_2 ile gazlandırılan Tyrode solüsyonu (mM olarak NaCl 136.75, KCl 2.68, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.95, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4166, $NaHCO_3$ 11.904, glukoz 5.05) içeren 20 ml'lik organ banyolarına asıldı. Banyo sıcaklığı 21 °C derecede muhafaza edildi. Dokular daha sonra bir saat süresince inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon sırasında dokular her 15 dakikada bir Tyrode solüsyonu ile yıkandı. Bir saatlik inkübasyon sonunda dokulara deneysel protokol uygulandı. Cevaplar izometrik transducer aracılığı ile MP35 sistemi üzerine kaydedildi.

Deney protokolü

İlk olarak, L-sistein/ H_2S yolağının fare fundus dokusundaki, depolarizan aracılı kasılma yanıtları üzerindeki etkisinin araştırılması için kümülatif KCl kasılma yanıtları oluşturuldu. Farelerden izole edilen fundus preparatları bir saatlik ön inkübasyon sonrasında kümülatif olarak KCl (10-80 mM) ile kastrıldı. Birinci seri kasılma yanıtları elde edildikten sonra dokular Tyrode solüsyonu ile yıkandı ve 30 dakikalık ara inkübasyona bırakıldı. Bu ara inkübasyon sonrasında aynı deney protokolü uygulanarak ikinci seri yanıtlar elde edildi. İkinci seri yanıtlar elde edildikten sonra dokular tekrar Tyrode solüsyonu ile yıkandı ve 30 dakika inkübe edildiler.

İnkübasyon sonrasında üçüncü seri KCl kasılma yanıtları oluşturuldu. İkinci deney grubunda ise, L-sistein' in KCl kasılma yanıtlarındaki etkisinin araştırılması için izole fundus şeritlerinde ön inkübasyonu takiben yukarıdaki protokolün aynısı uygulanarak birinci seri ve ikinci seri kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları elde edildi. Ardından dokular Tyrode solüsyonu ile yıkandı ve 30 dk inkübasyon süresi boyunca L-sistein (10 mM) ile muamele edildi ve bu sürenin sonunda üçün seri kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları elde edildi.

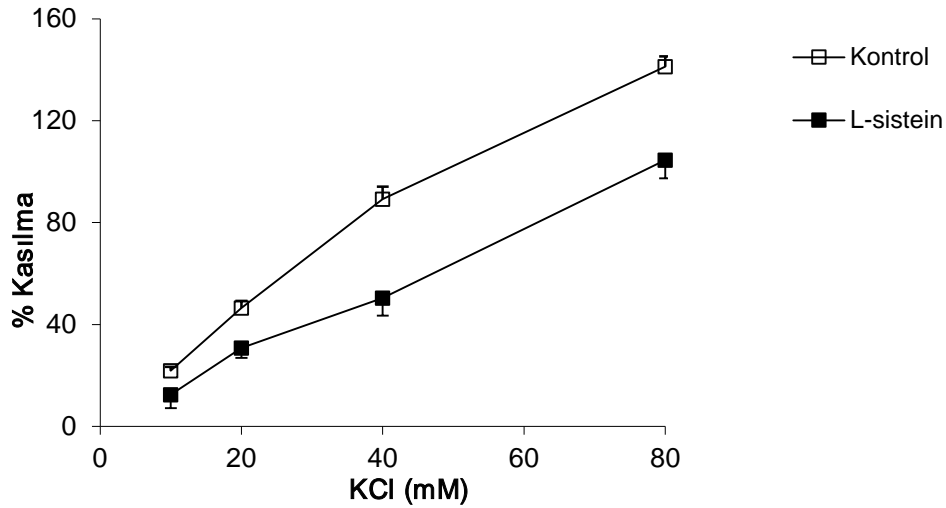
Diğer deney gruplarında ise, H₂S sentez enzimleri olan CBS ve CSE 'nin inhibitörleri aminooksi asetik asit (AOAA) ve proparjil glisin (PAG) varlığında L-sistein' in kümülatif KCl kasılma yanıtları üzerindeki etkisi araştırıldı. Benzer şekilde, ön inkübasyon sonrasında izole fundus şeritlerinde 1. ve 2. seri kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları oluşturuldu. İkinci seri kasılma yanıtlarından sonra Tyrode solüsyonu ile yıkanan dokular 30 dk boyunca L-sistein (10 mM) +PAG (10 mM) veya L-sistein (10 mM) +AOAA (1 mM) kombinasyonu ile muamele edildi. Bu sürenin sonunda, kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları elde edildi. Ayrıca, nitrik oksid (NO) ve siklooksijenaz (COX) yollarının L-sistein' in bu etkisindeki katkısını araştırmak amacıyla nitrik oksid sentaz (NOS) enzim inhibitörü L-nitroarjinin (L-NA, 0.1 mM) ve non-selektif COX enzim inhibitörü indometazin varlığında mevcut deney serileri çalışıldı. İlave

olarak, L-NA (0.1 mM) ve indometazin (0.001 mM) içeren ortamda L-sistein'in (10 mM) kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları üzerindeki etkisi PAG veya AOAA varlığında incelendi.

Kullanılan ilaçlardan amino-oksiasetik asit (o-karboksimetil) hidroksilamin hemihidroklorür, indometazin, L-nitroarjinin (N^ω-Nitro-L-arjinin), D,L-proparjil glisin, L-sistein SIGMA firmasından, potasyum klorür MERCK firmasından temin edildi. İndometazin stok solüsyonu etanol içerisinde hazırlandı ve Tyrode solüsyonu içerisine eklendi. Diğer tüm maddeleri solüsyonları distile su içerisinde hazırlandı. L-sistein, amino-oksiasetik asit, indometazin, potasyum klorür, L-nitroarjinin, proparjil glisin ve Tyrode solüsyonu günlük olarak hazırlandı.

İstatistiksel analiz

Kümülatif KCl ile oluşturulan üçüncü seri kasılmalar, ikinci seri maksimum KCl kasılmasının yüzdesi olarak değerlendirildi. İkinci seri maksimum KCl (80 mM) kasılması 100 olarak kabul edildi. Üçüncü serideki KCl kasılmaları bu değere göre oranlandı. Grupların % değerleri ortalama (X)±Standart Hata şeklinde ifade edildi. Gruplar arasındaki üçüncü seri kasılma yanıtları istatistiksel olarak unpaired-t testi, tek yönlü varyans analizi ve Bonferroni-t testi ile karşılaştırıldı. 0.05'ten küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi ($P<0.05$).



Şekil 1. İzole fare mide fundus şeritlerinde kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları üzerine L-sistein (10 mM)'in etkisinin grafiği. Kontrol grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Veriler ortalama ± SH olarak ifade edildi (n=6).

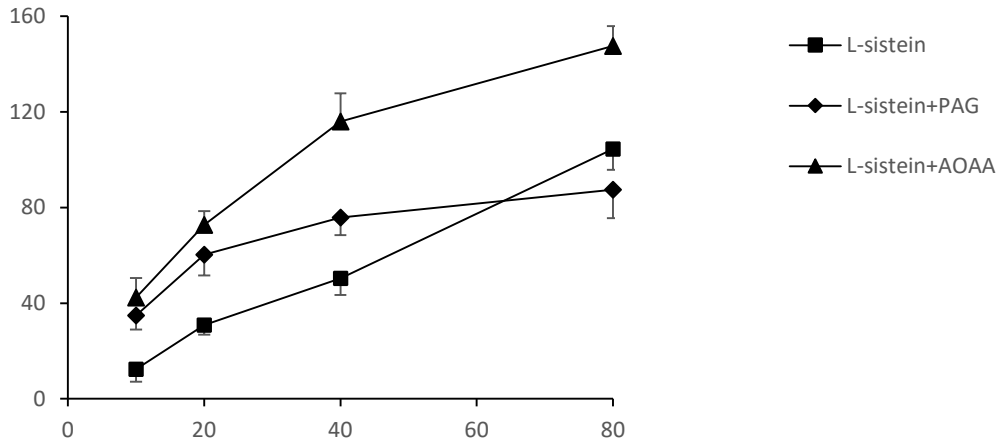
BULGULAR

Fare fundus dokusunda L-sistein 'in kümülatif KCl kasılma yanıtları üzerine etkisi

Fare fundus dokusunda L-sistein/ H₂S yolağının, depolarizan aracılı kasılma üzerindeki etkisinin araştırılması için kümülatif KCl kasılma yanıtları oluşturuldu. Dokulara kümülatif KCl (10-80 mM) uygulandığında konsantrasyona bağlı bir kasılma yanıtı elde edildi. KCl ile oluşan maksimum kasılma yanıtı kontrol grubunda % 141.2±4.1 iken L-sistein varlığında bu kasılma yanıtı % 104.5±7.1 idi. L-sistein varlığında KCl kasılma yanıtlarında anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 1; $P<0.05$, n=6).

CBS ve CSE enzim inhibitörleri varlığında L-sistein'in KCl kasılma yanıtları üzerine etkisi

Çalışmamızda, L-sistein' in KCl kasılma yanıtları üzerindeki etkisinde endojen H₂S'in rolünü belirlemek amacıyla, L-sistein 'in kümülatif KCl yanıtları üzerindeki etkisi CBS ve CSE enzim inhibitörleri varlığında araştırıldı. CBS enzim inhibitörü AOAA varlığında, L-sistein 'in neden olduğu inhibisyon anlamı olarak geri çevrildi ($P<0.05$, n=6). CSE enzim inhibitörü PAG ise, L-sistein 'in 10, 20 ve 40 mM konsantrasyondaki KCl yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini azalırken ($P<0.05$, n=6), maksimum kasılma yanıtı üzerindeki inhibe edici etkisi üzerinde bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 2; Tablo 1)



Şekil 2. İzole fare mide fundus şeritlerinde, PAG (10 mM) ve AOAA (0.1 mM) varlığında L-sistein (10 mM)'in kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları üzerine etkisinin grafiği. * L-sistein grubuna; +L-sistein+AOAA grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edildi (n=6).

Tablo 1. İzole fare mide fundus şeritlerinde, CBS ve CSE enzim inhibitörleri varlığında L-sistein (10 mM)'in KCl ile oluşan kasılma yanıtlarının E_{maks} değerleri üzerindeki etkisi.

	L-sistein	L-sistein+AOAA	L-sistein+PAG
E _{maks} (%)	104.5±7.1	147.60±8.3*	87.40±11.9+

Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edildi (n=6).

* L-sistein grubuna göre;+ L-sistein+AOAA grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$).

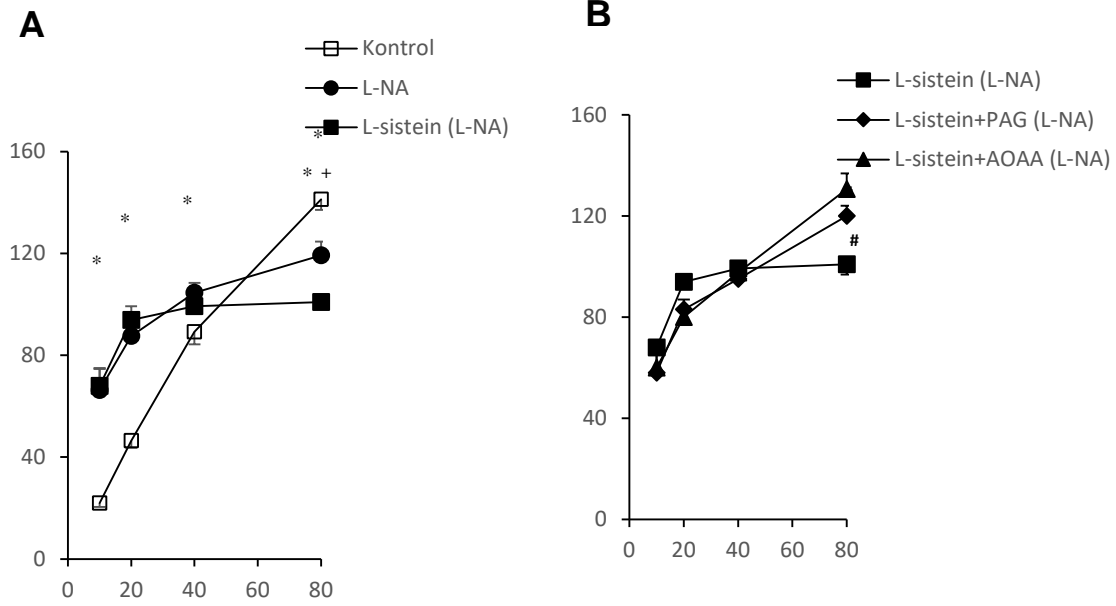
NOS enzim inhibitörü varlığında L-sistein' in KCl kasılma yanıtları üzerindeki etkisi

L-sistein 'in KCl yanıtları üzerindeki etkisinde NO'nun olası katkısının araştırılması için deneyler NOS enzim inhibitörü L-NA varlığında gerçekleştirildi. L-

NA içeren ortamda düşük konsantrasyonlardaki KCl kasılma yanıtlarında kontrole göre anlamlı bir artış gözlenirken, maksimum KCl yanıtında ise anlamlı bir azalma elde edildi (Tablo 2; $P<0.05$, n=6). L-NA içeren ortamda L-sistein, 10, 20 ve 40 mM konsantrasyonlardaki KCl yanıtları üzerinde bir

inhibisyona oluşturmazken ($P>0.05$, $n=6$), maksimum kasılma yanıtları üzerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmaya neden oldu (Şekil 3A, Tablo 2, $P<0.05$, $n=6$). Ayrıca, PAG ve AOAA'nın L-NA içeren ortamda L-sistein'in KCl yanıtları

üzerindeki etkisindeki rolü de araştırıldı. L-NA içeren ortamda, PAG ve AOAA L-sistein'in maksimum KCl kasılmaları üzerindeki inhibe edici etkisinin anlamı olarak geri çevrilmesine neden oldu (Şekil 3B, Tablo 2, $P<0.05$, $n=6$).



Şekil 3. İzole fare mide fundus şeritlerinde, L-NA (0.1 mM) varlığında L-sistein (10 mM)'in kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları üzerine etkisi (A) ve PAG (10 mM) ve AOAA(1 mM)'nın L-NA içeren ortamda L-sistein (10 mM)'in kümülatif KCl (10-80 mM) yanıtları üzerine etkilerinin grafiği (B). * Kontrol grubuna; *L-NA grubuna; # L-sistein grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edildi ($n=6$).

Tablo 2. İzole fare mide fundus şeritlerinde, L-NA varlığında L-sistein (10 mM)'in KCl ile oluşan kasılma yanıtlarının E_{maks} değerleri üzerindeki etkisi.

	E _{maks} (%)
Kontrol	141.20 \pm 4.1
L-NA	119.30 \pm 5.4*
L-sistein+L-NA	100.90 \pm 1.8*+
L-sistein+ L-NA+ AOAA	130.60 \pm 6.2#
L-sistein+ L-NA+ PAG	120.00 \pm 4.0*#

Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edildi ($n=6$). * Kontrol grubuna;+ L-NA grubuna göre; #Lsistein+L-NA grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$).

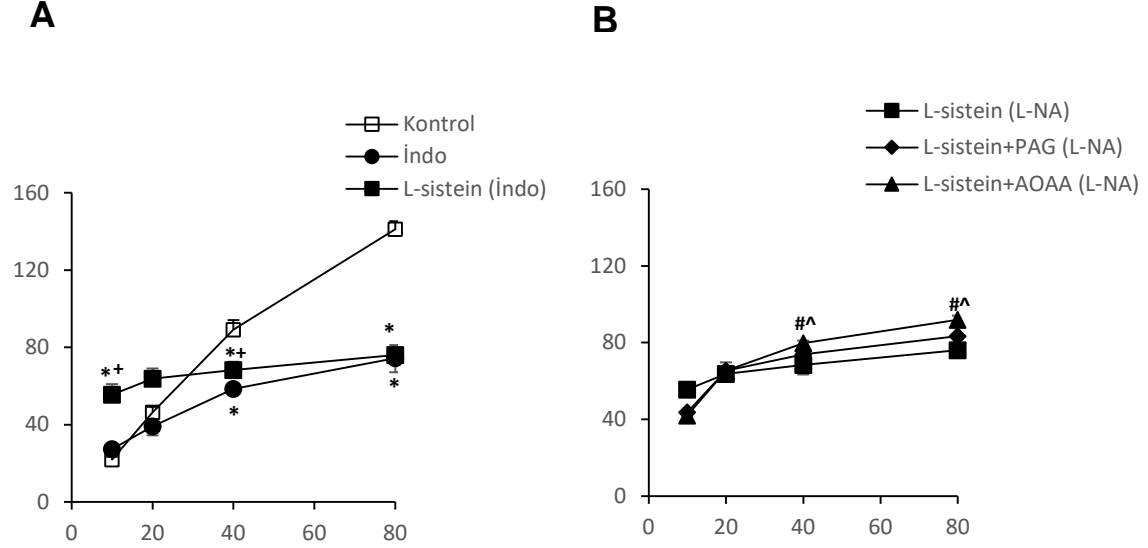
COX enzim inhibitörü varlığında KCl kasılma yanıtları

COX enzim inhibitörü indometazin varlığında, yüksek konsantrasyonlardaki KCl yanıtlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ($P<0.05$, $n=6$). İndometazinli ortamda, L-sistein ise

indometazin içermeyen ortamdaki etkisinin aksine düşük konsantrasyondaki KCl kasılmaları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olurken ($P<0.05$, $n=6$), maksimum kasılma yanıtları indometazin'in etkisine göre bir değişiklik oluşturmadı. (Şekil 4A; Tablo3; $P>0.05$; $n=6$). İndometazin içeren ortamda, PAG ve AOAA'nın

da etkileri incelendi. AOAA, yüksek konsantrasyondaki KCl kasılma yanıtlarında L-

sistein ve L-sistein+PAG kombinasyonuna göre artışa neden oldu (Şekil 4B; Tablo 3; $P<0.05$, $n=6$).



Şekil 4. İzole fare mide fundus şeritlerinde, indometazin (İndo; 0.001 mM) varlığında L-sistein (10 mM)'in kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları üzerine (A) ve PAG (10 mM) ve AOAA(1 mM)'nın İndo içeren ortamda L-sistein (10 mM)'in kümülatif KCl (10-80 mM) yanıtları üzerine etkilerinin grafiği (B). * Kontrol grubuna; +İndo grubuna; #L-sistein grubuna; ^L-sistein+PAG grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edildi ($n=6$).

Tablo 3. İzole fare mide fundus şeritlerinde, İndo varlığında L-sistein (10 mM)'in KCl ile oluşan kasılma yanıtlarının E_{maks} değerleri üzerindeki etkisi.

	E_{maks} (%)
Kontrol	141.2 \pm 4.1
İndo	74.40 \pm 7.3*
L-sistein+ İndo	76.05 \pm 1.8*
L-sistein+ İndo+ AOAA	91.90 \pm 2.1*+^#
L-sistein+ İndo+ PAG	83.45 \pm 2.2* ∞

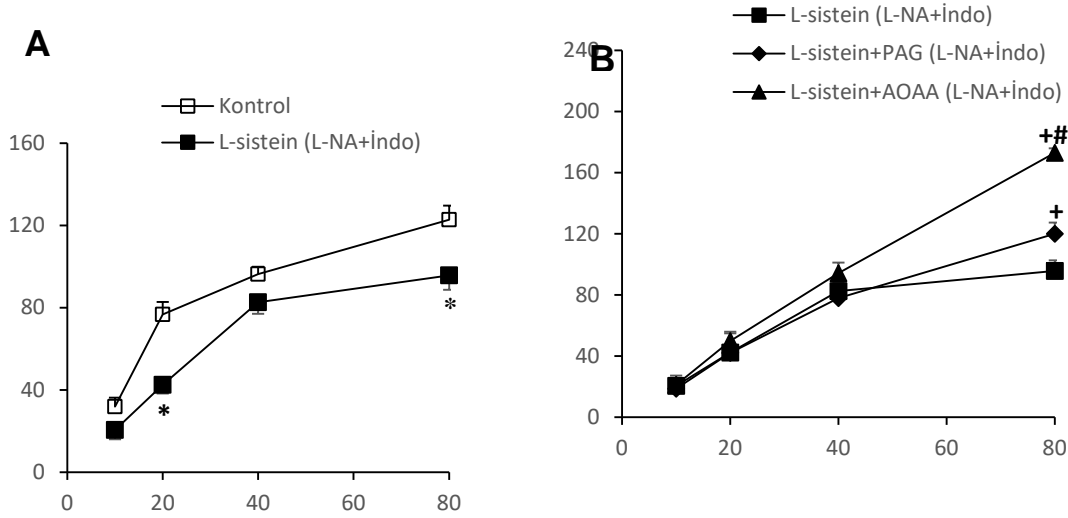
Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edildi ($n=6$).

* Kontrol grubuna;+ İndo grubuna; #Lsistein+L-İndo grubuna; ∞ L-sistein+İndo+AOAA grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$).

NOS ve COX inhibitörleri varlığında L-sistein'in KCl kasılmaları üzerine etkisi

Düşük konsantrasyonlardaki KCl kasılmalarında, L-NA ve indometazin varlığında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken ($P<0.05$, $n=6$), yüksek konsantrasyonlardaki kasılma yanıtlarında anlamlı bir

değişiklik gözlenmedi ($P>0.05$, $n=6$). L-NA ve indometazin varlığında, L-sistein maksimum kasılma yanıtında inhibitör etki oluşturdu (Şekil 5A; Tablo 4; $P<0.05$, $n=6$). L-sistein'in maksimum KCl yanıtlarında neden olduğu bu inhibitör etki ise PAG ve AOAA varlığında geri çevirildi. (Şekil 5B; Tablo 4; $P<0.05$, $n=6$).



Şekil 5. İzole fare mide fundus şeritlerinde L-NA (0.1 mM) ve indometazin (İndo; 0.001 mM) kombinasyonunu içeren ortamda, L-sistein (10 mM)'in kümülatif KCl (10-80 mM) kasılma yanıtları üzerine (A) ve PAG (10 mM) ve AOAA (1 mM) varlığında L-sistein (10 mM)'in kümülatif KCl (10-80 mM) yanıtları üzerine etkilerinin grafiği (B). * Kontrol (L-NA+İndo) grubuna; +L-sistein (L-NA+İndo) grubuna; # L-sistein+PAG (L-NA+İndo) grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Veriler ortalama \pm SH olarak ifade edildi (n=6).

Tablo 4. İzole fare mide fundus şeritlerinde, L-NA ve İndo varlığında L-sistein (10 mM)'in KCl ile oluşan kasılma yanıtlarının E_{max} değerleri üzerindeki etkisi.

	E _{max} (%) (ort \pm SD)
L-NA+İndo	122.80 \pm 6.9
L-sistein+ L-NA+İndo	95.65 \pm 7.0*
L-sistein+ L-NA+ İndo+ AOAA	173.00 \pm 3.0*+
L-sistein+ L-NA+ İndo+ PAG	120.00 \pm 10.8+#

* L-NA+İndo grubuna; + L-sistein+L-NA+İndo grubuna; #L-sistein+L-NA+L-İndo+AOAA grubuna göre anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$).

TARTIŞMA

Çalışmamızda, izole fare mide fundus dokusunda L-sistein/H₂S yolunun KCl kasılmaları üzerindeki etkisi araştırıldı. Kümülatif KCl uygulaması, fare mide fundus dokusunda konsantrasyona bağlı olarak kasılma yanıtlarının oluşmasına neden oldu. L-sistein/H₂S yolunun bu kasılma yanıtları üzerindeki etkisinin araştırılması için, endojen H₂S substratı L-sistein kullanıldı. L-sistein, KCl kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden oldu. Bu azalmanın endojen H₂S oluşumu ile ilişkisi, endojen H₂S oluşumundan sorumlu CBS ve CSE enzimlerinin inhibitörleri olan AOAA ve PAG varlığında incelendi. PAG varlığında, L-sistein' in

düşük konsantrasyonlardaki KCl kasılmaları yanıtları üzerindeki inhibitör etkisi azalırken, maksimum kasılma yanıtı üzerindeki inhibitör etkisinde bir değişiklik gözlenmedi. AOAA ise, L-sistein 'in KCl kasılma yanıtlarında neden olduğu inhibe edici etkinin geri çevrilmesine neden oldu. Bu bulgu, L-sistein 'in KCl kasılma yanıtlarında neden olduğu inhibitör etkiyi endojen H₂S oluşumu aracılığıyla gerçekleştirdiğini göstermektedir. Ayrıca, hem CSE hem de CBS enziminin bu dokudaki varlığını fonksiyonel olarak teyit etmektedir.

Çalışmamız, L-sistein 'in maksimum KCl kasılma yanıtı üzerindeki inhibe edici etkisinin PAG varlığında değişmezken sadece AOAA varlığında geri çevrilmesi, fare mide fundus dokusunda CBS

ve CSE enzim ekspresyon ve fonksiyonlarının farklılığından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Xiao ve arkadaşları (2015), tarafından fare mide fundus dokusunda CSE ve CBS enzimlerinin ekspresyonları gösterilmiştir. Ayrıca, PAG varlığında değişmezken AOAA varlığında mide içi basıncın belirgin derecede azaldığı bildirilmiştir. Xiao ve arkadaşları (2015), CBS kaynaklı H₂S fare midesindeki adaptif ve reseptif gevşemelere katkısı olduğu ileri sürmüşlerdir²². Rodent kolonunda, H₂S sentezinde öncelikli olarak CBS enziminin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür²³. Bulgumuza benzer olarak, H₂S'in gastrointestinal yapıda inhibitör nitelikte bir rolü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir¹¹⁻¹⁵. H₂S donörü olan NaHS, farklı türlere ait mide fundus, ileum ve distal kolon preparatlarında konsantrasyona-bağlı olarak gevşeme yanıtının oluşmasına neden olmuştur^{5,11,14,15}. L-sistein ve ekzojen H₂S'in inhibe edici etkisinin olduğu, tavşan mide şeritleri ve insan alt özofagus sifinkteri muskarinik kasılma yanıtları, tavşan alt özofagus sifinkterinde ise nörojenik kasılmalar ve insan kolonundaki spontan kasılmalar üzerinde gösterilmiştir²⁴⁻²⁷. Bulgumuzun ters yönünde, sıçan ve fare aorta dokusunda ise, ekzojen H₂S varlığında fenilefrin ve KCl kasılmalarında artış gözlenmiştir²⁸. Doku farklılığından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Non-adrenerjik non-kolinergik (NANK) sinirlerden salıverilen NO gastrointestinal motilitesini düzenleyen en önemli inhibitör nitelikteki mediyatördür. Bu nedenle, çalışmamızda L-sistein'in KCl kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisinde NO'nun olası katkısı NOS enzim inhibitörü L-NA varlığında araştırıldı. İlk olarak, L-NA düşük konsantrasyondaki KCl yanıtlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artışa neden olurken, maksimum KCl kasılma yanıtında bir inhibisyona neden oldu. L-sistein, L-NA varlığında düşük konsantrasyondaki kasılma yanıtlarındaki artış üzerinde bir etki oluşturmazken, maksimum KCl yanıtının azalttı. Bu bulgu bize, L-sistein'in düşük dozlarda neden olduğu inhibisyonu NO ile ilişkili olabileceğini veya bu dokuda en önemli gevşetici faktör olan NO'nun uzaklaştırılmasının neden olduğu artan kasılma yanıtlarının üstesinden gelemediğini düşündürmektedir. H₂S ile NO'nun etkileşimi ile ilgili farklı bulgular mevcuttur.

Vasküler dokularda ekzojen H₂S'in vazodilatör etkisinin NOS inhibitörleri veya endotelium'un uzaklaştırılması ile azaldığı bulunmuş ve H₂S

gevşemelerinde endotelium'dan NO veya diğer endotel kaynaklı relaksan faktörlerin salıverilmesinin rolü olabileceği ileri sürülmüştür²⁹⁻³¹. Farklı olarak, L-sisten varlığında fare mide fundus dokusundaki NANK gevşeme yanıtlarının arttığı, fakat ekzojen ve endojen H₂S ile oluşan gevşeme yanıtlarında NO/sGMP yolağının katkısı olmadığı bildirilmiştir^{14,22}. İnsan kolon preparatlarında ise H₂S donörü NaHS'in spontan kasılmalar üzerindeki inhibe edici etkisinin NOS inhibitörü L-NA ve guanil siklaz enzim inhibitörü ODQ ile kısmen geri çevrildiği gösterilmiştir²⁶. Kubo ve arkadaşları, ekzojen H₂S'in ekzojen H₂S'in, eNOS'un direkt inhibisyonu ve/veya NO'yu yakalaması olmak üzere iki farklı mekanizma ile NO'nun vazodilatör etkisini baskılaması sonucunda fenilefrin ve KCl kasılma yanıtlarının artışına neden olduğunu ileri sürmüştür²⁸. Bu bulgular, endojen H₂S'in fare mide fundus dokusundaki inhibitör etkisinde NO'nun direkt veya indirekt olarak katkısının olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, PAG ve AOAA'nın L-NA içeren ortamda L-sistein'in maksimum kasılma yanıtında neden olduğu inhibe edici etkiyi geri çevirmesi bu inhibisyona başka mekanizmaların da aracılık ettiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, L-sistein'in neden olduğu bu inhibitör etkide COX yolağının olası rolü indometazin varlığında araştırıldı. İlk olarak, indometazin varlığında, maksimum KCl kasılma yanıtında kontrole göre anlamlı bir inhibisyon gözlemlendi. L-sistein ise, kontrol grubunda oluşturduğu etkinin aksine indometazin varlığında düşük konsantrasyonlu kasılma yanıtlarında anlamlı bir artışa neden oldu. Ancak, indometazin varlığında azalmış olan maksimum KCl kasılma yanıtları üzerinde bir değişiklik oluşurmadı. Bu bulgu, fare mide fundus dokusunda L-sistein'in neden olduğu inhibisyonla direkt veya indirekt olarak COX yolağının ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bulgumuza benzer olarak, kobay mesanesinde H₂S donörü GYY4137 ve fare korpus kavernozum dokusunda ise H₂S donörü NaHS ile oluşan gevşeme yanıtlarının indometazin ile azaldığı bildirilmiştir^{19,20}. Ayrıca, Fernandes ve arkadaşları (2015), GYY4137 gevşemelerinin spesifik COX-1 blokörü olan SC560 ile inhibe olurken, spesifik COX-2 inhibitörü olan NS398 ile değişmediğini göstermiş ve H₂S yanıtlarında COX-1 ürünlerinin aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir. Sıçan mezenterik arterinde ise, ekzojen H₂S donörü NaHS'in hem vazokonstriktör hem de vazodilatör etkisinin arazidonik asit yolağıyla ilişkili olduğu

bildirilmiştir²⁰. Farklı olarak, sıçan korpus kavernoza dokusunda H₂S donörleri ile oluşan intrakavernozal basınç artışının araşidonik asit yolağında bağımsız olduğu ileri sürülmüştür³². Mevcut çalışmalarla bizim çalışmamızı değerlendirmizde, fare fundus dokusunda endojen H₂S'in KCl kasılmaları üzerindeki inhibe edici etkisinde COX yolağının ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Ancak, indometazin varlığında düşük konsantrasyonlardaki KCl kasılma yanıtlarındaki artışın aydınlatılması için ilave çalışmalara gerek vardır.

NO ve COX yolaklarının L-sistein'in neden olduğu KCl kasılmaları üzerindeki ilişkisini tamamiyle ortadan kaldırmak için deneylerimiz L-NA ve indometazin kombinasyonu ortamda gerçekleştirildi. Bu deney grubunda, L-sistein 20 mM ve 80 Mm konsantrasyonlarındaki KCl kasılma yanıtları üzerinde inhibe edici bir etkiye neden oldu. PAG ve AOAA varlığında, maksimum kasılma yanıtları üzerindeki inhibisyona anlamlı olarak geri çevrildi. PAG'in sade Tyrode içeren ortamda L-sistein'in inhibe edici etkisini değıştirmezken, L-NA, indometazin ve L-NA+indometazin kombinasyonunun bulunduğu ortamda maksimum KCl kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkiyi azalttığı gözlemlendi. Benzer olarak, AOAA da L-NA ve indometazin içeren ortamda L-sistein'in KCl kasılmaları üzerindeki etkisini sade Tyrode içeren ortama göre geri çevirmesi daha belirgindi. Bunun nedeni, H₂S ve NO veya COX ürünleri arasında bir kompensatör ilişki olmasından kaynaklanabilir ve açıklanması için ilave deneylere gerek duyulmaktadır. Bu bulgular bize, L-sistein'in KCl kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisinde NO ve COX yolakları haricinde başka mekanizmaların da rolü olduğunu düşündürmektedir. NOS ve COX inhibitörleri varlığında diğere mekanizmalar araştırılmalıdır.

Sonuç olarak, bulgularımız fare fundus dokusunda L-sistein/ H₂S yolağının KCl kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisinde NO ve COX yolaklarının direkt veya indirekt katkısının olduğunu, ancak L-sistein/H₂S yolağının etkisinde başka mekanizmalarında rolü olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug*. 2007;6:917-35.
2. Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem*. 2009;146:623-6.
3. Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y et al. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Commun*. 2013;4:1-7.
4. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996;16:1066-71.
5. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237:527-31.
6. d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F et al. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:4513-8.
7. Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel RP et al. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal Biochem*. 2005;341:40-51.
8. Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson RJ. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:1-10.
9. Fang L, Zhao J, Chen Y, Ma T, Xu G, Tang C et al. Hydrogen sulfide derived from periaortic adipose tissue is a vasodilator. *J Hypertens*. 2009;27:2174-85.
10. Du JT, Li W, Yang JY, Tang CS, Li Q, Jin HF. Hydrogen sulfide is endogenously generated in rat skeletal muscle and exerts a protective effect against oxidative stress. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126:930-6.
11. Teague B, Asiedu S, Moore PK. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol*. 2002;137:139-45.
12. Gallego D, Clavé P, Donovan J, Rahmati R, Grundy D, Jiménez M et al. The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterol Motil*. 2008;20:1306-16.
13. Gil V, Gallego D, Jiménez M. Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *Br J Pharmacol*. 2011;164:485-98.
14. Dhaese I, Lefebvre RA. Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. *Eur J Pharmacol*. 2009;606:180-6.
15. Dhaese I, Van Colen I, Lefebvre RA. Mechanisms of action of hydrogen sulfide in relaxation of mouse distal colonic smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 2010;628:179-86.
16. Schwizer W, Steingötter A, Fox M, Zur T, Thumshirn M, Bösigler P et al. Non-invasive

- measurement of gastric accommodation in humans. *Gut*. 2002;5:i59-i62.
17. Lefebvre RA, Smits GJ, Timmermans JP. Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br J Pharmacol*. 1995;116:2017-26.
 18. Arakawa T, Uno H, Fukuda T, Higuchi K, Kobayashi K, Kuroki T. New aspects of gastric adaptive relaxation, reflex after food intake for more food: involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves and nitric oxide. *J Smooth Muscle Res*. 1997;33:81-8.
 19. Aydinoglu F, Ogulener N. The role of arachidonic acid/cyclooxygenase cascade, phosphodiesterase IV and Rho-kinase in H₂S-induced relaxation in the mouse corpus cavernosum. *Pharmacol Rep*. 2017;69:610-15.
 20. Fernandes VS, Xin W, Petkov GV. Novel mechanism of hydrogen sulfide-induced guinea pig urinary bladder smooth muscle contraction: role of BK channels and cholinergic neurotransmission. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;309:C107-16.
 21. Di Villa Bianca E, Sorrentino R, Coletta C, Mitidieri E, Rossi A, Vellecco V. Hydrogen sulfide-induced dual vascular effect involves arachidonic acid cascade in rat mesenteric arterial bed. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;337:59-64.
 22. Xiao A, Wang H, Lu X, Zhu J, Huang D, Xu Guo J, et al. H₂S, a novel gasotransmitter, involves in gastric accommodation. *Sci Rep*. 2015;5:1-9.
 23. Martin GR, McKnight GW, Dickey MS, Coffin CS, Ferraz JG, Wallace JL. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis*. 2010;42:103-9.
 24. Nalli AD, Rajagopal S, Mahavadi S, Grider JR, Murthy KS. Inhibition of RhoA-dependent pathway and contraction by endogenous hydrogen sulfide in rabbit gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;308:C485-95.
 25. Zhang L, Zhao W, Zheng Z, Wang T, Zhao C, Zhou G et al. Reduction of hydrogen sulfide synthesis enzymes in the esophagus of patients with achalasia: effect of hydrogen sulfide in achalasia. *Neurogastroenterol Motil*. 2015;27:1274-81.
 26. Martinez-Cutillas M, Gil V, Mañé N, Clavé P, Gallego D, Martín MT et al. Potential role of the gaseous mediator hydrogen sulphide (H₂S) in inhibition of human colonic contractility. *Pharmacol Res*. 2015;93:52-63.
 27. Kara H, Isli F, Ozturk Fincan GS, Yildirim S, Ercan S, Sarioglu Y. The effects of hydrogen sulfide on electrical field stimulation-induced neurogenic contractile responses in isolated rabbit lower esophageal sphincter: Contribution of nitrenergic and non-adrenergic non-cholinergic transmission. *Pharmacol Rep*. 2016;68:1350-57.
 28. Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Nishikawa H, Kawabata A. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology*. 2007;232:138-46.
 29. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20:6008-16.
 30. Zhao W, Wang R. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H474-80.
 31. Wang YF, Mainali P, Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yan H et al. Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121:420-3.
 32. Jupiter RC, Yoo D, Pankey EA, Reddy VV, Edward JA, Polhemus DJ et al. Analysis of erectile responses to H₂S donors in the anesthetized rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309:H835-43.