T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLİK SENDROMDA EREKTİL YANITLAR H2S İLE DEĞİŞİYOR MU?

Ezgi DAYAR

FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2016

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970154

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLİK SENDROMDA EREKTİL YANITLAR H2S İLE DEĞİŞİYOR MU?

FARMAKOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ezgi DAYAR

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Nergiz DURMUŞ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2014.KB.SAG.027(201427) proje ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970154

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Farmakoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Ezgi DAYAR **'METABOLİK SENDROMDA EREKTİL YANITLAR H2S İLE DEĞİŞİYOR MU '** konulu Yüksek Lisans tezini 17.06.2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç.Dr.Nergiz DURMUŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
BAŞKAN

Prof.Dr.Sedef GİDENER
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
ÜYE

Doç.Dr.Ozan BOZKURT
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
ÜYE

Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
YEDEK ÜYE

Doç.Dr.Ömer DEMİR
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ iii
ŞEKİL LİSTESİ iv
KISALTMALAR vi
ÖZET 1
1. GİRİŞ ve AMAÇ 5
2. GENEL BİLGİLER 8
2.1. Ereksiyon Fizyolojisi 8
2.2. Hidrojen Sülfür (H_2S) 10
2.2.1. H_2S'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 11
2.2.2. H_2S'ün Biyosentezi ve Metabolizması 11
2.2.3. H_2S'ün Kan ve Dokulardaki Fizyolojik Konsantrasyonları 15
2.2.4. H_2S Donör ve İnhibitörleri 17
2.2.5. H_2S'ün Fizyolojik ve Patofizyolojik Fonksiyonları 22
2.2.5.1. H_2S'ün Kardiyovasküler Etkileri 22
2.2.5.2. H_2S'ün Erektil Fonksiyonlar Üzerine Etkisi 24
2.2.5.3. H_2S'ün Endokrin Etkileri 27
2.3. Erektil Disfonksiyon 29
2.4. Metabolik Sendrom 30
2.4.1. Erektil Fonksiyonların Değerlendirildiği MetS Modelleri 33
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 35
3.1. Araştırmanın Tipi 35
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı 35
3.3. Araştırmanın evreni ve örneklemi 35
3.4. Çalışma Materyali 35
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 35
3.6. Veri Toplama Araçları 35
3.6.2. Biyokimyasal Analizler 37
3.6.3. Vücut ağırlığı ve Bel Çevresi Ölçümü 38
3.6.4. İnsülin Rezistansı Ölçümü 38
3.6.5. In vivo İntrakavernöz Basınç Ölçümü 38

3.6.6. İzole Organ Banyosunda gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi 41
3.6.7. Metilen Mavisi Deneyi ile H_2S Ölçümü 42
3.6.8. Kullanılan Araç, Gereç ve Kimyasallar 43
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi 46
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi 47
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları 47
3.10. Etik Kurul Onayı 47
4. BULGULAR 48
4.1. Biyokimyasal Parametlerin Değerlendirilmesi 48
4.2. Vücut Ağırlığı ve Bel Çevresi Ölçümlerinin Karşılaştırılması 52
4.3. İn vivo intrakavernöz basınç değerlendirilmesi ve H_2S'ün Etkisi 53
4.4. İn vitro organ banyosunda gevşeme yanıtları üzerine H_2S'ün etkisi 56
4.5. Penil dokudaki H_2S düzeylerinin değerlendirilmesi 57
5. TARTIŞMA 59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 66
7. KAYNAKLAR 67

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Yavaş salınımlı H_2S donörlerinin biyolojik özellikleri.....18

Tablo 2. H_2S-salıveren ilaç türevlerinin biyolojik özellikleri.....19

Tablo 3. H_2S Enzim İnhibitörleri.....21

Tablo 4. Metilen mavisi deneyinde kullanılan kimyasalları hacimleri.....42

Tablo 5. Plazma glukoz, trigliserid, ürik asit, insülin değerleri, HOMA-IR hesaplaması ve tansiyon ortalamaları.....50

Tablo 6. Deney hayvanlarının deney başlangıcı ve 10. hafta sonundaki ağırlıkları....51

Tablo 7. Kontrol ve metS grubu İKB/OAB ve EAA ortalamaları.....53

Tablo 8. Kontrol ve metS grubu SF ve NaHS enjeksiyonu öncesi ve sonrası (3.dakikadaki) İKB/OAB ve EAA ortalamaları.....55

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. NO/cGMP yolağı aracılığıyla gerçekleşen penil düz kas hücrelerinde gevşeme.....9

Şekil 2: Memeli hücrelerinde H_2S biyosentezi.....14

Şekil 3. H_2S metabolizasyon yolakları.....15

Şekil 4. Düz kas hücresinde H_2S ve NO yolakları.....27

Şekil 5. Deney hayvanlarının barındırıldığı kafesler.....36

Şekil 6. Deney protokolünün gruplara ve n sayısına göre ayrımını gösteren şema.....36

Şekil 7. Trakea ve karotis kanülasyonu.....38

Şekil 8. Penis kanülasyonu ve kavernöz sinir diseksiyonu.....39

Şekil 9. Kavernöz sinir uyarımı sonucu intrakavernöz basınç ve ortalama arteriyal basınç düzeyi.....41

Şekil 10. Araştırma Planı ve Takvimi.....45

Şekil 11. Kontrol ve metS gruplarında trigliserid değerleri karşılaştırılması.....47

Şekil 12. Kontrol ve metS gruplarında insülin değerleri karşılaştırılması.....48

Şekil 13. Kontrol ve metS gruplarında glukoz değerleri karşılaştırılması.....48

Şekil 14. Kontrol ve metS gruplarında ürik asit değerleri karşılaştırılması.....49

Şekil 15. Kontrol ve metS gruplarında HOMA-IR karşılaştırılması.....49

Şekil 16. Kontrol ve metS gruplarında tansiyon ortalamaları karşılaştırılması.....50

Şekil 17. Kontrol ve metS grubu ağırlık ortalamaları karşılaştırılması.....52

Şekil 18. Kontrol ve metS grubu bel çevresi/tibia uzunluğu ortalamları karşılaştırılması.....52

Şekil 19. Kontrol ve metS grubu İKB/OAB ortalamaları karşılaştırılması.....53

Şekil 20. Kontrol ve metS grubu EAA ortalamaları karşılaştırılması.....53

Şekil 21. Kontrol grubu SF ve NaHS enjeksiyonu öncesi ve sonrası İKB/OAB ortalamaları karşılaştırılması.....54

Şekil 22. MetS grubu SF ve NaHS enjeksiyonu öncesi ve sonrası İKB/OAB ortalamaları karşılaştırılması 55

Şekil 23. Kontrol ve metS grubunda fenilefrin ile kastırılan dokuların L-sistein aracılı maksimal gevşeme yanıtları.....56

Şekil 24. Kontrol ve metS gruplarında bazal homojenatlarda H_2S düzeyleri karşılaştırılması.....57

Şekil 25. Kontrol ve metS gruplarında L-sistein ile uyarılmış homojenatlarda H_2S düzeyleri karşılaştırılması.....57

KISALTMALAR

MetS..... Metabolik sendrom
ED..... Erektil disfonksiyon
H_2S..... Hidrojen sülfür
NaHS..... Sodyum hidrosülfit
NaCl..... Sodyum klorür
İKB..... İntrakavernöz basınç
OAB..... Ortalama arteriyel basınç
EAA..... Eğri altında kalan alan
Emax..... Maksimal gevşeme
NANK..... Non-adrenerjik non-kolinerjik sistem
NO..... Nitrik oksit
CO..... Karbon monoksit
nNOS..... Nöronal nitrik oksit sentaz
eNOS..... Endotelyal nitrik oksit sentaz
sGC..... Çözülebilir guanilat siklaz
GTP..... Guanozin trifosfat
PKG..... Protein kinaz G
CSE..... Sistationin γ-liyaz
CBS..... Sistationin β-sentaz
3-MST..... 3-merkaptopürivat sülfürtransferaz
CAT..... Sistein aminotransferaz
K^+_{ATP} kanalları..... ATP-bağımlı potasyum kanallarını
BH_4..... Tetrahidrobiopterin
PDE5..... Fosfodiesteraz tip 5
PDE5i..... PDE5 inhibitörleri
KAH..... Koroner arter hastalığı
cGMP..... Siklik guanozin monofosfat
Ach..... Asetilkolinin
MLC..... Miyozin hafif zincir

PI3-kinaz..... Fosfatidilinositol3-kinaz

PLP..... Pridoksal 5'-fosfat

HPLC..... Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ZnS..... Çinko sülfit

DPD..... *N,N*-dimetil-p-fenilendiamin

ZnAc..... Çinko asetat

TCA..... Trikloroasetik asit.

$FeCI_3$..... Demir-III-klorür

Na_2S..... Sodyum sülfit

ADT-OH..... 5-(4-hidroksifenil)-3H-1,2-ditiyol-3-tion

DATS..... Diallil trisülfit

SAC..... S-allilsistein

SPRC..... S-propargilsistein

NSAIDs..... Nonsteroid antiinflamatuvar

ACS14..... S-aspirin

ACS15..... S-diklofenak

ATB346..... S-naproksen

BCA..... Beta-siyano-L-alanin

PAG..... Propargilglisin

AOAA..... Aminooksiasetik asitin

HIF..... Hipoksi-kaynaklı faktör

VEGF..... Vasküler endotelyal büyüme faktörü

MAPK..... Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz

L-NAME..... Nitro-L-arjinin metil ester

INS-1E..... Pankreatik insülinoma hücre hattı

HIT-T15..... insülin-salgılayan hücre hattı

NOD fare..... Non-obez diabetik fare

I/R..... İskemi reperfüzyon

MMAS..... Massachusetts Erkek Yaşlanma Çalışması

ATP III..... Yetişkin Tedavi Paneli III

NCEP..... ABD Ulusal Kolesterol Eğitim Programı

DSÖ..... Dünya Sağlık Örgütü

METSAR..... Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması

VLDL..... Düşük yoğunluklu lipoprotein

HDL..... Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HOMA-IR..... Homeostatik Model Değerlendirmesi-Insulin Rezistansı

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bütün tecrübe, bilgi ve birikimlerini aktaran, bilimsel ve akademik anlamda her türlü desteği sağlayan, sabrı ve ilgisiyle hem kişisel hem de bilimsel gelişimime büyük katkıları olan, yanında çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, örnek aldığım danışman hocam Doç. Dr. Nergiz DURMUŞ'a,

Çalışmalarımız boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı Farmakoloji Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Sedef GİDENER'e,

Deney çalışmaları ve araştırma döneminde desteklerinden dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ozan BOZKURT'a,

Tez çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim laboratuvarının kapılarını bana sonuna dek açan, bilgi ve bilimsel gelişimime önemli katkılar sağlayan, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Günay Yetik ANACAK'a ve tez çalışmalarımın aşamalarında bıkmadan usanmadan her türlü yardımını sağlayan ekip arkadaşım Ecz. Mehmet Vehbi DERELİ'ye,

Yüksek lisans eğitimim süresince her türlü desteklerini esirgemeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda bulunan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Tüm tez çalışmalarım boyunca birlikte çalıştığımız ve çalışmaktan büyük keyif aldığım ekip arkadaşım Dr. Erkan KARA'ya,

Çalışmalarım sırasında desteklerini sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Biyokimyager Cemre URAL, Biyolog Eda KAHVE, Ecz. Özge ÖZZAYİM, Biyolog Ali ALVANDIAN ve Biyolog Oktay KESİCİ'ye,

Her konuda bana sonsuz destek olan ve sabırla yanımda duran çok sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Biyolog Ezgi DAYAR

İzmir-2016

ÖZET

Metabolik Sendromda Erektil Yanıtlar H_2S ile Değişiyor mu?

Ezgi Dayar. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı. 35340 Balçova-Izmir

Metabolik sendromun (metS) ilk belirtilerinden biri olan erektil disfonksiyon (ED), ereksiyon fizyolojisinde rol alan yolaklardaki bozulma sonucu meydana gelmektedir. Nitrik oksit gibi regülatör bir gazotransmiter olarak bilinen hidrojen sülfür (H_2S), hipertansiyon, insülin salınımı ve özellikle ereksiyon fizyolojisinde vasküler tonusun düzenlemesinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı, metS modeli oluşturulan sıçanların penil hemodinamiği üzerinde sodyum hidrosülfitin (NaHS, H_2S donörü) etkisini ve penil dokudaki H_2S düzeyini değerlendirerek metS'da H_2S'ün erektil fonksiyonlar üzerine olası etkisini ortaya koymaktır.

Wistar sıçanlar randomize olarak standart diyet ile beslenen kontrol grubu ve %60 oranında yüksek fruktozlu diyet ile beslenen metS grubu olarak ikiye ayrılmıştır. MetS modeli biyokimyasal analizler (serum trigliserid, ürik asit, kan glukoz ve insülin değerleri), bel çevresi/tibia uzunluğu oranı, HOMA-IR (Homeostatik Model Değerlendirmesi-İnsülin Rezistansı) ve kan basıncı parametreleri ile değerlendirilmiştir. Penil hemodinamik parametreleri ise kavernöz sinir uyarılması sırasında intrakavernöz basınç (İKB)/ortalama arteriyel basınç (OAB) oranı ve eğri altında kalan alan (EAA) ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Bu ölçümler intrakavernöz NaHS (100µg/50µl) ve kontrolü olarak %0.9 NaCl (50µl) enjeksiyonu öncesinde ve sonrasında olmak üzere iki kere yapılmıştır. In vitro olarak aortada L-sistein aracılı gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Penil dokuda H_2S düzeyleri ise metilen mavisi yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

MetS grubunda trigliserid ve insülin değerleri, HOMA indeksi, vücut ağırlığı, bel çevresi/tibia oranı ve kan basıncı kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. MetS grubunda İKB/OAB oranı ve EAA anlamlı olarak düşüktür. İntrakavernöz NaHS uygulaması ise yine metS grubunda İKB/OAB oranında ve EAA'da bir artışa yol

açmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlılık sadece İKB/OAB oranında saptanmıştır. Kontrol grubundaki NaHS uygulaması sonucu görülen artış ise anlamlı değildir. In vitro deneylerde, metS grubunda aortada L-sistein aracılı oluşan maksimal gevşeme (Emax) yanıtlarında bir değişiklik saptanmamıştır. Penil dokudaki H_2S düzeylerinin ise metS grubunda azaldığı gösterilmiştir.

MetS'a bağlı olarak penil dokuda H_2S düzeylerinin azalması ve penil hemodinamiğinin NaHS aracılığıyla düzeltilmesi, H_2S'ün MetS-aracılı ED'da yeni bir terapötik hedef olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: metabolik sendrom, erektil disfonksiyon, hidrojen sülfür, fruktoz.

SUMMARY

Do Erectile Responses Change In The Presence Of H_2S In The Metabolic Syndrome?

Ezgi Dayar. Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences, Department of Pharmacology. 35340 Balcova-Izmir

Erectile dysfunction (ED), a general marker for metabolic syndrome (metS), occurs as a result of impairment in pathways of erectile physiology. Hydrogen sulphide (H_2S), another gasotransmitter like NO, has been revealed to involving in hypertension, insulin secretion, and regulation of vascular tone especially in erectile physiology. The aim of this study is to investigate sodium hydrosulphide (NaHS, H_2S donor) on penile hemodynamic and H_2S levels in the penile tissues in MetS rat model.

Wistar rats were randomly divided into 2 groups as; control and MetS, which were fed with standard diet (SD) and 60% high fructose diet (HFD) for 10 weeks, respectively. MetS model was evaluated with biochemical analyses [serum triglyceride, uric acid, blood glucose, and insulin levels], waist circumference/tibia length ratio, HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance), mean blood pressure. Penile hemodynamic parameters were evaluated by the measurement of intracavernous pressure (ICP)/mean arterial pressure (MAP) ratio and area under curve (AUC) during cavernous nerve (CN) stimulation in the presence and absence of intracavernous injection of NaHS (100µg/50µl) and its control %0.9NaCl (50µl) in metS and control groups.In vitro l-cysteine mediated relaxation responses were evaluated in the aorta. H_2S levels were measured in penile tissues by methylene blue assay.

Triglycerides and insulin levels, HOMA index, weight, waist circumference/tibia percent and blood pressure were significantly increased in MetS group when compared to control group. HFD attenuated ICP/MAP and AUC in MetS group. Intracavernous administration of NaHS caused an increase in ICP/MAP ratio and AUC in the MetS group but statistically significant difference is only determined in

ICP/MAP ratio. In control group NaHS caused an increase in ICP/MAP ratio but the differences were not statistically significant. L-cysteine mediated maximal relaxation responses did not change in metS group. H_2S levels were decreased significantly in the penil tissues of the MetS group.

Decreased H_2S levels in penile tissue and recovery of penile hemodynamic by NaHS in MetS group reveals the significant role of H_2S in the MetS-dependent ED that could be a new therapeutic target.

Key words: Metabolic syndrome, erectile dysfunction, hydrogen sulphide, fructose.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sağlıklı bir penil ereksiyon, parasempatik sistem, sempatik sistem, non-adrenerjik non-kolinerjik sistem (NANK), nitrik oksit (NO) ve çeşitli elektrofizyolojik olaylar tarafından düzenlenen ve birkaç sinyal yolağının entegrasyonu ile sonuçlanan korporal düz kaslara bağlı hemodinamik bir süreçtir [1-3].

NO'in yanı sıra ereksiyon fizyolojisinde rolü olduğu gösterilen diğer bir gazotransmiter olan hidrojen sülfür (H_2S), penil ereksiyondaki yolakları kontrol eden bir mediyatördür. H_2S, memeli hücrelerinde sistationin γ-liyaz (CSE), sistationin β-sentaz (CBS) ve 3-merkaptopürivat sülfürtransferaz (3-MST) enzimleri aracılığıyla L-sistein'den sentezlenmektedir [4]. H_2S de NO gibi vasküler tonusun kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. H_2S, dokuların çeşitli türlerinde (mezenterik arter, aorta) damar genişletici bir faktör olarak bilinmektedir. Doğrudan ATP-bağımlı potasyum kanallarını (K^+_{ATP}) [5, 6] veya voltaj bağımlı potasyum kanallarını [7] açarak damar basıncının azalmasına aracılık etmektedir. Sıçan aortası ve mezenterik damar yataklarında endoteli hasara uğratılmış dokuların gevşeme yanıtlarının zayıfladığı bilgisinden yola çıkarak H_2S'ün vasküler etkilerinin endotel bağımlı olduğu düşünülmektedir [6, 8]. Bunun yanı sıra fosfodiesteraz tip 5 (PDE-5) enzimini inhibe ederek NO'in sentezini arttırdığından cGMP yıkımını da önlemektedir [9]. Damar etkileri yanında penil dokudaki etkilerine bakıldığında ise klinik öncesi hayvan modelleri ve in vitro insan dokusunda yapılan çalışmalar gevşeme yanıtı oluşturduğu yönündedir. Yapılan bir çalışmada insan penil dokusunda CBS ve CSE enzimlerinin varlığı gösterilmiş ve bu enzimlerin elde edilen doku homojenatlarında L-sistein'i H_2S'e çevirdiğini gösterilmiştir. Aynı zamanda in vitro koşullarda insan korpus kavernozum dokusunda eksojen olarak H_2S donörü uygulandığında gevşeme oluştuğu, H_2S enzim inhibitörleri varlığında ise gevşeme yanıtının azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada sıçanlar üzerinde in vivo kavernöz basınç ölçümlerinde de aynı sonuçlar elde edilmiştir [10].

Damarlarda doza bağımlı olarak gevşeme oluşturduğu bildirilen ve yeni bir vazodilatör olarak tanımlanan H_2S'ün iskemi reperfüzyon (I/R), kalp yetmezliği,

hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklardaki rolü işaret edilmekte ve bu alandaki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bunun yanısıra H_2S'ün penil dokuda erektil fonksiyona katkıda bulunduğu bulgusu son derece yeni bir bulgudur ve ED'da H_2S ile ilgili bilgiler sınırlıdır.

ED seksüel birleşme için yeterli ereksiyona ulaşamama veya yeterli sürede ereksiyonu sürdürememe olarak tanımlanmaktadır [11]. 40-70 yaş grubundaki erkeklerin yaklaşık %50'sini etkilemekte olup bu dünya genelinde yaklaşık 150 milyon erkeğin etkilendiğini göstermektedir [12]. ED hipertansiyon, dislipidemi, obezite gibi kardiovasküler hastalıklar ile ortak olan risk faktörlerini taşımaktadır. Bu risk faktörlerinin bir arada görüldüğü MetS'lu hastalarda ED gelişimi daha da artmaktadır [13]. MetS'un ilk bulgusu olan ED gelecekte ortaya çıkabilecek olan kardiyovasküler hastalıklarında ilk belirtisi olabileceği öne sürülmektedir [14, 15]. Yapılan çalışmaların sonucunda MetS hastalarının %96.5'da ED olduğu bildirilmiştir [16, 17]. ED'un kardiyovasküler hastalıklarda olduğu gibi MetS ve insülin rezistansının habercisi olabileceği de iddia edilmektedir [14]. Ülkemizde MetS tanısı alan 236 erkekle yapılan bir klinik çalışmada %96,5'sında ED, %39,6'sında cinsel isteksizlik, %22,7'sinde erken boşalma gözlemlendiği bildirilmektedir. Bal ve ark.'ları tarafından yapılan bu çalışmada azalmış ereksiyon fonksiyonu skoru ile artmış metabolik risk faktörleri arasındaki güçlü korelasyon gösterilmiştir [18]. Aynı grup bir başka çalışmasında MetS'lu hastalarda penil doplerle yapılan ölçümlerle MetS-ED ilişkisini ortaya koymuşlardır [19]. MetS'da ED mekanizmalarını araştıran deneysel çalışmalara bakıldığında genetik olarak obez olan sıçanların penil dokularında NO sentezinden sorumlu olan nNOS ve eNOS ekspresyonunun ve aktivitesinin değiştiği, rhoA/rhokinaz yolağının etkinliğinin arttığı [20, 21], insüline bağlı gevşeme yanıtlarının bozulduğu, MAPK inhibitörü varlığında insülin yanıtlarının arttığına ise sadece penil arterde değinilmektedir [22]. Yine bu modelde penil arterde nöronal ve endotelyal gevşeme yanıtlarının bozulduğu NADPH oksidaz inhibitörü varlığında ve eNOS kofaktörü tetrahidrobiopterin (BH_4) eklendiğinde bu yanıtların düzeldiği gösterilmiştir [23]. Yüksek yağ diyeti ile beslenen sıçanlarda erektil fonksiyonların bozulduğu [24, 25] rhoA/rhokinaz yolağı ve eNOS ekspresyonunun azaldığı [25], tavşanlarda ise korpus

kavernozumunda düz kas/fibröz doku oranının arttığı bildirilmektedir [26]. MetS ve ED ilişkisi yeni bir bilgi olmayıp yapılan klinik ve deneysel çalışmalarla da ortaya konmuştur. Ancak ED'un MetS'da yüksek oranda görülmesi ve erken dönem bulgusu olması mekanizmasını açıklamaya yönelik çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Amaç

MetS-ED ilişkisini değerlendirmek amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda genellikle yüksek yağ diyeti kaynaklı ve genetik temelli metS modeli ve hayvan modelleri kullanılarak erektil yanıtlar değerlendirilmiştir. Yüksek fruktozlu diyetle oluşturulan hayvan modelinde hipertrigliseridemi, hiperinsülinemi, bozulmuş glukoz toleransı, hiperürisemi, hipertansiyon ve bunlara bağlı gelişen endotel disfonksiyonu gibi metS'un birçok özelliği gelişmektedir. Fruktoz ile oluşturulan metS modeli insanda görülen metS'a en yakın modellerden biridir ve literatürde bu modelde penil hemodinamiği değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yine yapılan literatür araştırmalarında MetS-ED ilişkisinde NO yanıtlarının araştırıldığı görülmektedir ancak H_2S etkilerine dair bilgi bulunmamaktadır. ED için birçok risk faktörünün bir araya gelmesiyle oluşmuş olan MetS'da görülen ED tedavisine yönelik henüz bir yol kat edilmemiştir ve araştırmaya açık bir konudur.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızdaki amacımız yüksek fruktozlu diyet ile metS modeli oluşturulan sıçanlarda ED oluşumunu belirlemek, H_2S'ün kavernöz sinir uyarımı aracılı intrakavernöz basıncı üzerindeki etkisini değerlendirmek ve sıçanların penil dokularındaki H_2S miktarını saptayarak, H_2S'ün MetS'a bağlı ED'da rolünü ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

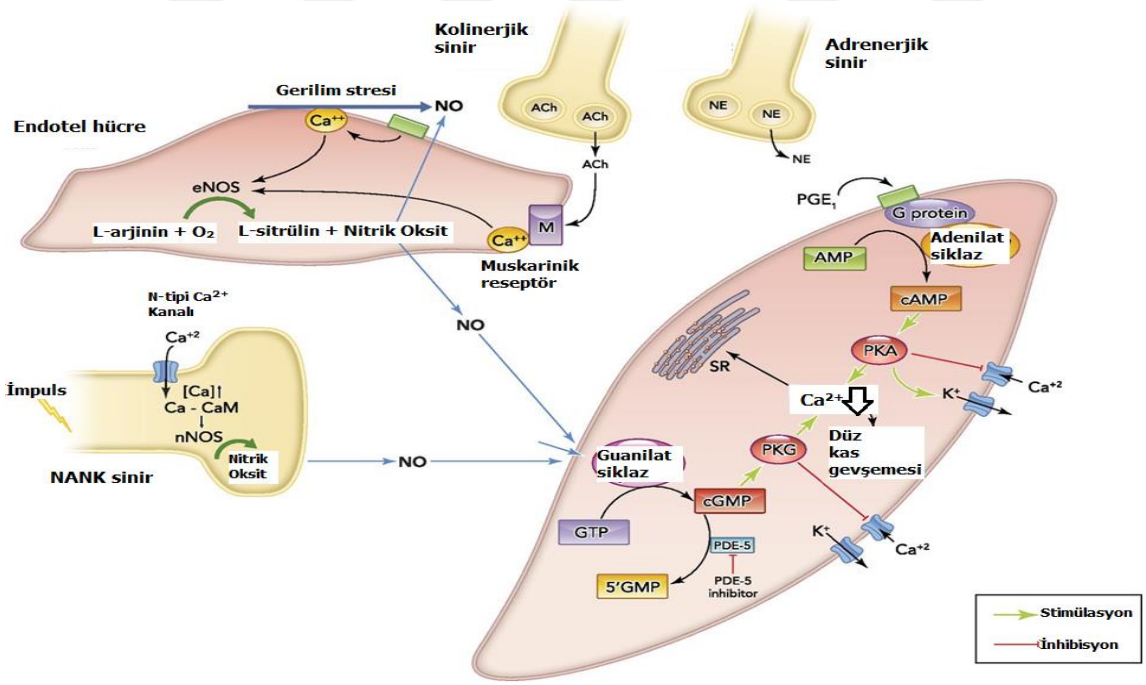
2.1. Ereksiyon Fizyolojisi

Ereksiyon, çeşitli düzeylerde nöronal ve humoral mekanizmaların etkileşimine dayanan vasküler bir olaydır. Ereksiyon, penil afferentler tarafından başlatılan spinal refleks olarak bilinmektedir, ancak aynı zamanda görsel, koku ve düşsel uyaranlar tarafından gerçekleşir. Bu uyaranlara bağlı olarak sakral parasempatik (pelvik), sempatik torakolombar ve somatik (pudenda) sinirlerinin innervasyonu sonucu penil dokudaki vazodilatasyon artışı ile peniste ereksiyon gerçekleşir. Bu nedenle ereksiyon birkaç sinyal yolağının entegrasyonu ile sonuçlanır [3].

Penil ereksiyon vazodilatör ve vazokonstriktör tonus arasındaki dinamik denge tarafından düzenlenir. Kasıcı ve gevşetici faktörler arasındaki denge ve etkileşim penis düz kas tonusunda belirleyicidir. Penis dokusunda meydana gelen vazodilatasyon tümesansın başlangıcından sorumluyken, vazokonstriksiyon detümesansı sağlar. Tümesans hem kolinerjik hem de nitrerjik sistem aracılığıyla gerçekleşirken, detümesans α-adrenoreseptör aktivitesi sonucu kasılma yanıtının artması ve PDE5 enziminin aktivasyonu yoluyla cGMP miktarının azalması sonucu oluşur. Vazokonstriksiyona alfa-adrenerjik reseptörler dışında endotelin, anjiotensin ve tromboksan A2'nin uyarılmasıyla RhoA/Rho-kinaz yolağı aracılık eder ve bu durumda detümesans başlar, penis flasid haldedir. Tümesans ise, duysal uyarının santral sinir sistemindeki yolakları aktive etmesiyle başlamaktadır. Bu süreç penisi innerve eden, kolinerjik ve nonadrenerjik-nonkolinerjik periferal sinirleri aktive etmektedir [27]. Bu sinirlerin uyarılması sonucu sinir ucundan ve endotel hücrelerinden penil ereksiyondaki yolakları kontrol eden ve tümesansın başlamasına aracılık eden, gaz yapılı bir nörotransmiter olan NO salınmaktadır [27, 28]. NO'in yanı sıra ereksiyon fizyolojisinde rolü olduğu gösterilen iki gaz yapılı nörotransmiter daha bulunmaktadır. Bunlar karbon monoksit (CO) ve H_2S olarak bilinmektedir [28].

Penil ereksiyonda NO/cGMP yolağı korpus kavernozum düz kaslarında gevşemeye aracılık eden klasik yolak olarak kabul edilmiştir. Tümesansın başlamasına korpus kavernozumda sinir ucundan nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) enzimi

tarafından sentezlenen NO [29] ve parasempatik sinir uyarımı sonucu sinir ucundan salınan asetilkolinin (Ach) endoteldeki muskarinik reseptörleri uyarması sonucu; endotelden endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimi tarafından sentezlenen NO aracılık eder. NO salınımı ile çözülebilir guanilat siklaz (sGC) aktive olur ve böylece guanozin trifosfattan (GTP) ikincil mesajcı olan siklik guanozin monofosfat (cGMP) dönüşümü gerçekleşir. Kavernoz dokuda cGMP, K^+ kanallarında membran bağlı proteinlerin fosforilasyonunu başlatan protein kinaz G'yi (PKG) stimüle eder. Bu da K^+ iyonlarının ekstrasellüler matrikse akışına neden olarak hiperpolarizasyon ile sonuçlanır. Böylece L-tipi Ca^{2+} kanalları kapanarak intrasellüler Ca^{2+} iyon konsantrasyonu azalır. Bununla birlikte, miyozin hafif zincir (MLC) kinazın aktivasyonu azalır, MLC zincirin fosforilasyonu azalır ve böylece aktin-miyozin etkileşimi azalarak kavernozal gevşeme gerçekleşir. Bunları takiben, artan kan akımı ile indüklenen gerilim stresi, PI3-kinaz (fosfatidilinositol3-kinaz)/Akt/eNOS yolağını aktive etmesi sonucu, NO salınımında bir artışa neden olarak tümesansın devamını sağlar ve fizyolojik ereksiyon gerçekleşir (Şekil 1) [30-32].



Şekil 1. NO/cGMP yolağı aracılığıyla gerçekleşen penil düz kas hücrelerinde gevşeme [31]

2.2. Hidrojen Sülfür (H_2S)

Yirmi yıl öncesine kadar toksik ve potansiyel olarak öldürücü bir gaz olarak bilinen H_2S, son yıllarda yapılan çalışmalar doğrultusunda NO ve CO'e ek olarak gazotransmiter ailesinin en geç üyesi olarak tanımlanmıştır [33].

Fizyolojik bir mediyatör olarak bilinen H_2S, diğer gazotransmiterlerle ortak karakteristik özellikler taşımaktadır. Gazotransmiterler hücre membranlarından kolaylıkla difüze olabilen ve hücresel sinyal yolaklarını regüle edebilen gaz yapılı sinyal moleküleridir. Bu özellikleri ile membran reseptörlerine ve ikincil mesajcı sistemine ihtiyaç duymazlar. Bunlar vücutta endojen ve enzimatik olarak üretilebilen, fizyolojik konsantrasyonlarda iyi tanımlanmış spesifik fonksiyonlara sahip mediyatörler olarak bilinirler [34].

H_2S'ün memeli dokularındaki varlığı 1980'li yıllarda biliniyordu, ancak fizyolojik rolü göz ardı edilerek metabolik bir atık ürün olarak bilinmekteydi. 1980 yılında Kruszyna ve ark.'ları, azotlu bileşikler aracılığıyla gerçekleşen gevşeme yanıtlarında siyanür ve sülfür bileşiklerinin etkisini tanımlamıştır [35]. H_2S'ün fizyolojik rolü ise ilk kez 1996 yılında Abe ve Kimura tarafından ortaya konmuştur. Bu çalışmada beyinde H_2S üretiminin enzimatik üretim mekanizması, biyolojik etkileri, fizyolojik konsantrasyon aralığı tanımlanmıştır [36]. 1997 yılında ise, Hosoki, Matsuki ve Kimura, NO'in da foksiyonlarının birleştiği yer olan vasküler sistem üzerinde H_2S'ün fizyolojik rolünü tanımlamışlardır. H_2S üreten enzimlerin mRNA'sının ileum, portal ven ve torasik aortada eksprese edildiği ve aynı zamanda spesifik H_2S enzim inhibitörlerinin H_2S üretimini bloke ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, adı geçen düz kas dokularına eksojen H_2S uygulamasıyla H_2S'ün gevşeme yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir. H_2S'ün çok daha düşük konsantrasyonları, NO'in torasik aortada oluşturduğu gevşeme yanıtını daha çok artırdığı belirtilmiştir [37].

Son yıllarda hızla artan çalışmalarla birlikte H_2S'ün sitoprotektif bir endojen modülatör olarak birçok fizyolojik fonksiyonu tanımlanmıştır. Nörolojik, kardiyak, endokrin, kardiyovasküler, gastrointestinal, solunum ve erektil fonksiyonları regüle

eden hücresel sinyal yolaklarında rol oynayan H_2S, hücre metabolizması, canlılığı, proliferasyonu ve apoptozisi modüle etmektedir [33, 38].

2.2.1. H_2S'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

H_2S, karakteristik olarak çürük yumurta kokusuna sahip, renksiz ve yanıcı bir gazdır. Hem suda hem de lipidde kolayca çözülebilir özelliğe sahiptir [39].

NO ve CO gibi H_2S de lipofiliktir ve diğer gazlardan nispeten daha az geçirgen olmasına rağmen plazma membranından kolayla geçebilir [40]. In vivo koşular altında H_2S çalışmalarındaki en büyük zorluklardan biri, bu molekülün yarılanma ömrünün çok kısa olmasıdır [41].

Zayıf bir asit olarak bilinen H_2S, fizyolojik olarak koşullar altında aşağıdaki şekilde dissosiasyona uğrar (pH=7,4, 37ºC, pKa=6,76, sulu çözelti):

$H_2S \leftrightarrow HS^- + H^+ \leftrightarrow S^{2-} + 2H^+$ [32]

Solüsyonda H_2S'ün 1/3'i ayrışmamış bileşik olarak bulunurken, 2/3'si HS^- (hidrosülfit anyonu) ve H^+'e (hidrojen katyonu) ayrışır. İkinci reaksiyon ise sadece yüksek pH'da gerçekleşirken, S^{2-}'e (sülfit iyonu) ayrışır. Ancak bu ayrışma fizyolojik koşullarda önemsizdir. Hem H_2S hem de HS^- sulu çözelti içinde bir arada bulunduğu için, etkilerini birbirinden ayırmak ve sinyal yolaklarına hangisinin katıldığını belirlemek mümkün değildir [39, 40]. Ayrıca H_2S'ün farklı sistemlerde gözlenen net biyolojik etkileri göz önünde bulundurulduğunda, H_2S komponentlerinden (H_2S, HS^- veya S^-) hangisinin aktif komponenti oluşturduğu hala bilinmemektedir [32].

2.2.2. H_2S'ün Biyosentezi ve Metabolizması

H_2S endojen olarak hem enzimatik hem de nonenzimatik yolaklar üzerinden sentezlenmektedir. Aynı zamanda intrasellüler sülfür depolarından da H_2S salınımı gerçekleştiği bilinmektedir.

Nonenzimatik H_2S sentezi, tiyol içeren moleküllerin H_2S'e indirgenmesi yoluyla gerçekleşir. Diğer gazotransmiterlere benzer olarak H_2S, hemoglobine yüksek affinite

gösterir [41]. Enzimatik olarak H_2S, L-sistein'den CBS, CSE ve tandem enzimler olan sistein aminotransferaz (CAT) ile 3-MST enzimleri tarafından sentezlenmektedir [42].

CBS ve CSE pridoksal 5'-fosfat (PLP,vitamin B_6)-bağımlı sitosolik enzimlerdir ve homosisteinin sisteine metabolize edildiği transsülfürasyon yolu enzimleri olarak bilinirler [39] (Şekil 2). CSE ve CBS enzimleri dokuya özgü dağılım gösterirler. CBS enzimi ağırlıklı olarak santral sinir sisteminde lokalize iken, CSE enzimi özellikle miyokardiyum ve vasküler düz kas hücreleri başta olmak üzere kardiyovasküler sistemde lokalizedir [43].

CBS enziminin, serin ve homosisteinin sistatiyonine PLP-bağımlı kondensasyonunu ve sistein ile homosisteinin sistatiyonin ve H_2S'e dönüşümünü katalizlediği bilinmektedir [38]. CBS homotetramerik bir proteindir ve üç tane yapısal bölgesi bulunmaktadır. N-terminal bölgesi hemi bağlar ve muhtemelen PLP ile etkileşir. Merkezi bölge katalitik bölgeyi içerir. C-terminal bölgesinin ise regulatör bölgeyi içerdiği bilinmektedir. N-terminal bölgesindeki hem varlığı, CBS'nin redoks mekanizması tarafından regüle edildiğini öne sürmektedir. Hem grubunda meydana gelen oksidasyon (yükseltgenme) enzim aktivitesinin artmasına, redüksiyon (indirgenme) ise aktivitenin azalmasına yol açmaktadır [44]. NO ve CO, CBS aktivitesini enzimin hem grubuna bağlanarak azalttığı bilinmektedir (Şekil 2) [39].

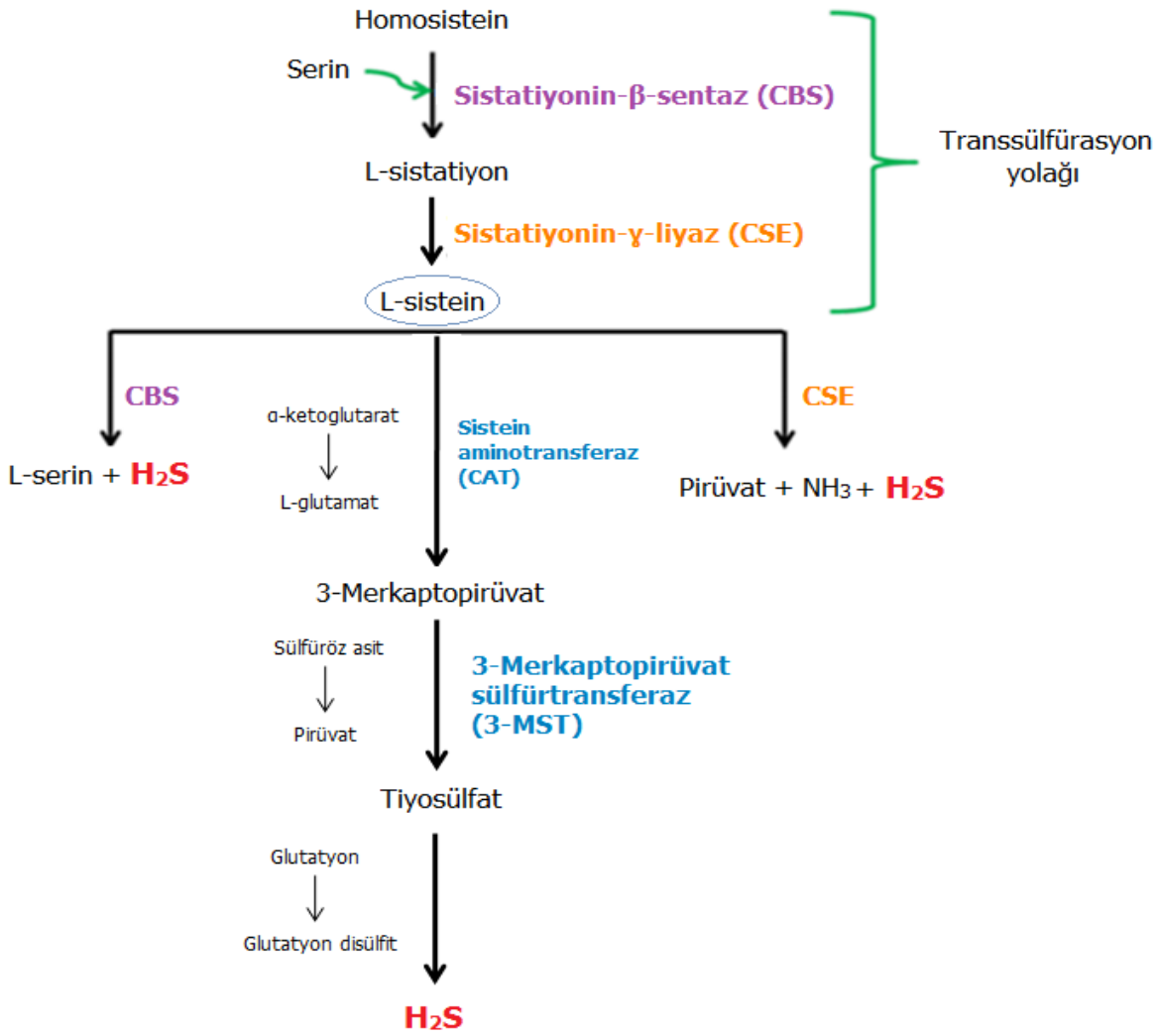
CBS enzimi temelde periferal sinir sistemde, beyin, karaciğer, böbrek ve penil dokuda eksprese edilmektedir [10, 38]. Ancak CBS enziminin ilk olarak astrositlerde lokalize olduğu ve H_2S'ün nöronal uzun vadeli potensiyalizasyon potansiyelinde (LTP) anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. CBS enziminin beyinde varlığı keşfedildikten sonra, nörolojik sinyal yolaklarını etkileyen birincil H_2S üreten enzim olarak tanımlanmıştır. CBS knockout farelerle yapılan çalışmalarda aortik endoteliyal disfonksiyon, anormal lipid metabolizması ve plak üretiminde artış gözlenmiştir [41].

CSE enzimi ise, L-sistein'in pirüvat, amonyak ve tiyosisteine dönüşümü katalize eder. Daha sonra tiyosistein nonenzimatik olarak sistein ve H_2S'e ayrışmaktadır[43]. CSE homotetramerik bir proteindir. Aktivitesi intrasellüler Ca^{2+} artışı ile gerçekleşmektedir ve tıpkı CBS enzimi gibi redoks mekanizması tarafından regüle

edilmektedir. CSE enzimi hidroliz yoluyla L-sistein'den H_2S, pirüvat ve amonyum iyonu üretimini sağlar. Alternatif olarak, CSE tarafından sistein tiyosisteine dönüştürülebilir. Oluşan tiyosisteinden, yine CSE enzimi tarafından H_2S ve sistein üretilir (Şekil 2) [44].

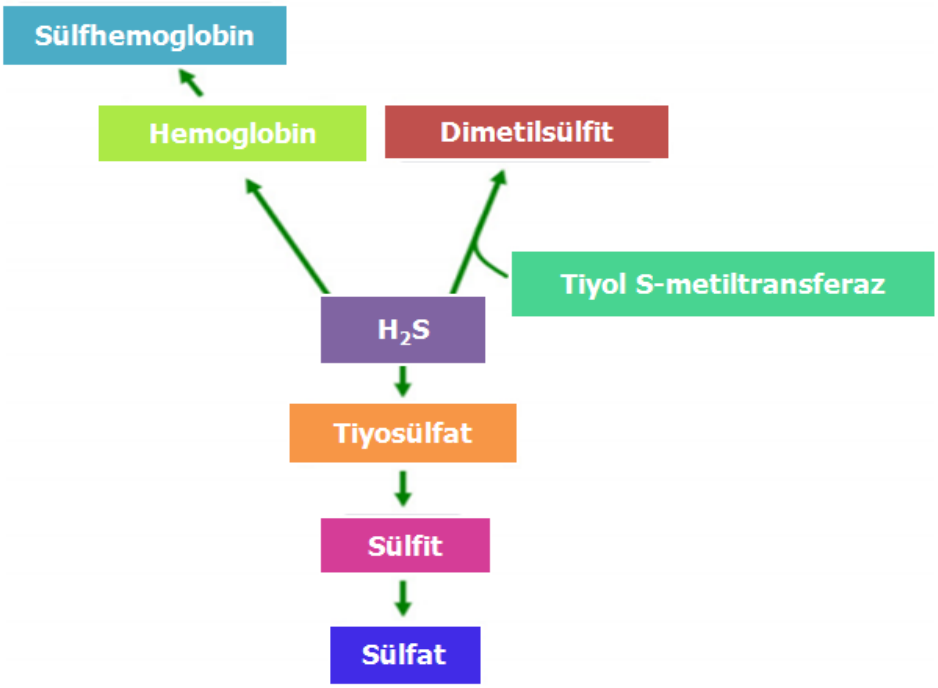
CSE enzimi ise beyin, akciğer, karaciğer, böbrek, penil doku ile vasküler ve vasküler olmayan düz kas hücrelerinde eksprese edilmektedir [10, 38].

CBS ve CSE'ın aksine 3-MST enzimi temel olarak mitokondride H_2S üretiminden sorumludur [39]. L-sistein ve alfa-ketoglutarattan CAT enzimi ile etkileşime girerek H_2S üretimini gerçekleştirildiği bilinmektedir [45]. CAT L-sistein ve alfa-ketoglutarat arasındaki reaksiyonu katalizler. Ardından 3-merkaptopirüvat ve L-glutamat sentezi gerçekleşir. 3-MST, 3-merkaptopirüvattan sülfürü transfer eder ve sülfüröz asit, pirüvat ve tiyosülfata dönüştürür. Ardından tiyosülfat, glutatyon varlığında, glutatyon disülfit ve H_2S'e indirgenir [43]. 3-MST knockout farelerde anksiyetenin artışı ile birlikte davranışsal bozukluklar tespit edilmiş ve bu da serotonin düzeylerinin upregüle olması ve H_2S aracılı antioksidan üretimin azalması ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2) [45].



Şekil 2: Memeli hücrelerinde H_2S biyosentezi

H_2S çeşitli yollarla hızla metabolize edilebilen kararsız bir moleküldür. Metabolizmasının uygun fizyolojik dengesinin muhafaza edilmesi amacıyla H_2S üç yolla elimine edilebilir. İlk olarak, mitokondriyal oksidasyon ile H_2S tiyosülfata dönüşür, bu dönüşümü sülfit ve sülfat dönüşümleri izler. İkinci metabolik yolak ise, tiyol S-metiltransferaz enzimi aracılığıyla gerçekleşen dimetilsülfit oluşumu sağlayan sitosolik metilasyondur. Son olarak, H_2S'ün hemoglobine bağlanması ile gerçekleşen sulfhemoglobin formasyonudur. Hem türevleri ile bu etkileşim, CO üretimi ile bir korelasyon sağlar (Şekil 3) [43, 45].



Şekil 3. H_2S metabolizasyon yolakları [43]

2.2.3. H_2S'ün Kan ve Dokulardaki Fizyolojik Konsantrasyonları

H_2S uzun yıllardan beri toksik bir madde olarak kabul edildiği bilinmektedir ve toksikolojik profilinin inhale edilen konsantrasyonuna bağlı olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. 20-100 ppm arasında akut H_2S maruziyeti göz irritasyonu, solunum güçlüğü ve baş ağrısına sebep olmaktadır. Maruz kalınan konsantrasyon 500 ppm'e kadar çıktığında ise bilinç kaybı, vasküler kollaps ve pulmonar ödem oluşur. 1000 pmm H_2S konsantrasyonu ise apneyi takiben respiratör kollaps, koma ve ölüme yol açmaktadır [43].

Kan ve dokulardaki serbest H_2S düzeylerinin gerçek seviyesi hala tartışma konusudur [46]. Fizyolojik H_2S konsantrasyonunun 1μM'ın altında olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarla, kanda 20-300 μM arasındaki H_2S konsantrasyonunun güvenli bir aralık oluşturduğu ve hala fizyolojik sınırlar içinde olduğu bildirilmiştir [47].

H_2S'ün bir çok biyolojik olayda büyük rol oynadığı bilindiğinden dolayı, kan ve dokulardaki konsantrasyonunun ölçümü H_2S biyokimyasının anlaşılması ve temel

fizyolojik fonksiyonlarının belirlenmesi için oldukça önemlidir. Deneysel çalışmalarda en çok kullanılan ve bilinen en eski H_2S ölçüm yöntemleri sülfit-sensitif iyon selektif elektrot (ISE) ve metilen mavisidir [43]. Monobromobimane (MBB) adı verilen gaz kromatografi yöntemi ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) mantığına dayanır. MBB, serbest H_2S düzeylerini ölçen bir yöntem olarak bilinmektedir [43, 48].

Deneysel çalışmalarda en çok kullanılan yöntem olarak bilinen metilen mavisi yöntemi, serum, plazma veya dokudaki H_2S düzeylerinin ölçüldüğü spektrofotometrik bir yöntemdir. Bu prosedürde biyolojik örnekteki sülfit çinko ile sabitlenir. Buradaki çinko H_2S'ün volatilizasyona (buharlaşma) ve hava ile oksidasyona uğramasını engeller. Güçlü asidik koşullar altında çinko sülfitten (ZnS) H_2S salınımı gerçekleşir. Ardından *N,N*-dimetil-p-fenilendiamin (DPD) ve Fe^{3+} varlığında metilen mavisi oluşur. Oluşan metilen mavisi spektrofotometri veya HPLC yöntemleriyle ölçülür. Metilen mavisi yöntemiyle sağlıklı insanların plazma veya serum H_2S düzeylerinin 20-60 µM arasında olduğu rapor edilmiştir. Ancak metilen mavisi yöntemiyle önemli ölçüde daha yüksek düzeylerde H_2S konsantrasyonları da tespit edilmiştir (>100 µM). Kemirgenlerde ise H_2S düzeyinin 300 µM'ı aştığı gösterilmiştir [46].

Deney prosedürünün kolay uygulanabilir olması ve spektrofotometrenin optik yoğunluk tespitini kapsayan oldukça basit kolorimetrik prosedürden oluşması metilen mavisi yönteminin avantajları arasındadır. Yöntemin başlıca dezavantajları ise, renkli maddeler ile çakışmalar meydana gelmesi, 1µM'ın altındaki H_2S düzeylerinin tespit edilememesi ve kalibrasyon eğrisinin non-lineer olmasıdır [48]. Tüm bunların yanında bu yöntem sadece H_2S'ü değil aynı zamanda biyolojik sistemlerde yaygın olarak bulunan Fe-S bölgesindeki sülfit iyonlarını da ölçmesi bu yöntemin en önemli sıkıntılarındandır [46, 48].

Tüm bu problemlere rağmen, metilen mavisi yöntemi birçok laboratuvar tarafından kullanılan ve kontrol ile tedavi örneklerinde H_2S düzeylerindeki göreceli farklılıklar belirlendiğinden dolayı birçok durumda kolayca uygulanabilir bir yöntemdir. Farmakolojik girişimlerin etkinliği hakkında bilgi sahibi olmamıza katkı sağlar.

2.2.4. H_2S Donör ve İnhibitörleri

Deneysel çalışmalarda en çok kullanılan H_2S üreten bileşikler, sülfit tuzları olarak bilinen, sodyum sülfit (Na_2S) ve sodyum hidrosülfit (NaHS)'tir. Na_2S ve NaHS'ten salınan H_2S'ün suda çözünürlüğü yüksek olduğundan, hızlı H_2S salınımlı donörler olarak bilinirler [49]. H_2S'ün gaz halindeki faza volatilizasyonu nedeniyle hiçbir zaman kararlı duruma ulaşamadığı için, H_2S maruziyeti geçicidir. Tek bir bolus Na_2S enjeksiyonu sonrasında, plazmada H_2S yarılanma ömrü insanlarda yaklaşık 20 dakika iken, farelerde bu süre beş dakikadır. Volatilitesi dışında H_2S oksidasyona karşı savunmasızdır. Bu sebeplerden dolayı, klinik pratikte sülfit tuzlarının terapötik potansiyel olarak kullanımı sınırlıdır [34].

L-sistein endojen H_2S üretimini arttırmak amacıyla deneysel çalışmalarda kullanılan H_2S prekürsörü olarak bilinmektedir. Ancak L-sistein birçok farklı yolak tarafından metabolize edildiği için çok tercih edilen bir H_2S dönörü değildir [39].

Yavaş salınımlı H_2S donörü olarak keşfedilen GYY4137, vazodilatör, antihipertansif ve anti-inflamatuar aktivite göstermektedir. GYY4137 de suda çözünen bir bileşiktir ve çözünmenin ardından spontan olarak yaklaşık dört saat H_2S salınımı gerçekleştirdiği bilinmektedir [34, 39, 50]. Diğer bir H_2S donörü olan tiyoamino asit, bikarbonat ile reaksiyona girerek H_2S salınımı yapar. Bu salınım GYY4137'den daha hızlı bir oranda gerçekleşirken, Na_2S ve NaHS'ten daha yavaş bir salınımdır. Tiyoamino asit aynı zamanda eNOS aktivitesini upregüle ederek NO üretimi sağlar ve dolayısıyla vazodilatasyona yol açtığı bilinmektedir [34]. Yavaş salınımlı H_2S donörlerinden bir diğeri de, 5-(4-hidroksifenil)-3H-1,2-ditiyol-3-tion (ADT-OH)'dur. ADT-OH, CSE enzimini aktive ederek güçlü vazorelaksan etkiye sahiptir, aynı zamanda oksidatif strese karşı nöroprotektif etki gösterirken, nöroinflamasyon önleyici etkisi de vardır (Tablo 1) [50, 51].

Güçlü kardiyovasküler koruyucu etkiye sahip olduğu bilinen sarımsak (*Allium sativum*), bu etkisini H_2S aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Oksidatif stres, platelet agregasyonu, plazma kolesterol konsantrasyonu ve kan basıncını azaltarak kardiyovasküler riski azaltan sarımsağın H_2S-salınımı yapan sentetik türevleri elde

edilmiştir [39]. Diallil trisülfit (DATS), stabil ve yavaş salınımlı H_2S donörü olarak bilinen taze sarımsak türevli polisülfit bileşendir. Yapılan bir çalışmada miyokardiyal I/R modelinde H_2S donörü olarak kullanılan DATS'ın koruyucu etkiye sahip olduğu ve kardiyoprotektif bir ajan olabileceği gösterilmiştir [52]. Kardiyoprotektif etkiye sahip olduğu bilinen diğer sarımsak türevli H_2S donörleri ise S-allilsistein (SAC) ve onun yapısal analoğu olan S-propargilsistein (SPRC)'dir (Tablo 1) [53].

Tablo 1. Yavaş salınımlı H_2S donörlerinin biyolojik özellikleri [50]

H_2S Donörü	**H_2S Salınım Mekanizması**	**Terapötik Etki**
GYY4137	Hidroliz	Vazodilatasyon Antihipertansif Anti-inflamasyon
Tiyoamino asit	Bikarbonat aktivasyonu	Vazodilatasyon
ADT-OH	Karboksilesteraz-aracılı metabolizasyon	Vazodilatasyon Oksidatif strese karşı nörolojik koruma Anti nöroinflamasyon
DATS	Hidroliz	Kardiyoprotektif İskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu
SAC	Hidroliz	Kardiyoprotektif Oksidatif strese karşı koruyucu
SPRC	Hidroliz	Kardiyoprotektif

Bunların dışında nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAIDs) H_2S-salıveren türevleri sentezlenmiştir. S-aspirin (ACS14), S-diklofenak (ACS15, ATB-337) ve S-naproksen (ATB346) bu ailenin içindedir ve H_2S'e hidroliz olurlar [39]. ACS14'ün güçlü antitrombotik ve antioksidan etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda ateroskleroz gelişimi ve I/R hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir [39, 50, 54]. Bir diğer H_2S salıveren ilaç türevi ise, ACS6'dır. ACS6, H_2S-salıveren sildenafil olarak bilinir ve yapılan çalışmalarla tavşanların korpus kavernozumunda gevşemeyi arttırdığı ve endotel hücrelerinde süperoksit anyonlarının üretimini azalttığı gösterilmiştir (Tablo 2) [39].

Tablo 2. H_2S-salıveren ilaç türevlerinin biyolojik özellikleri [50]

H_2S-salıveren İlaç	**Ana İlaç**	**Terapötik Etki**
ACS14	Aspirin	Antioksidan Antitrombotik Nöroprotektif Ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu İskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu
ACS15	Diklofenak	Anti-inflamasyon Antianjiyogenez Antikanser
ATB-337	Diklofenak	Anti-inflamasyon
ATB-346	Naproksen	Anti-inflamasyon
ACS6	Sildenafil	Pro-erektil Oksidatif strese karşı koruyucu

H_2S sentezinin farmakolojik inhibitörleri, H_2S üreten enzimlerin *knockdown'u*, ekspresyonunun azaltılması gibi bazı stratejiler H_2S üretimi ve etkisini bloke etmek için kullanılabilir.

siRNA CSE, CBS ve 3-MST enzim ekpresyonlarının *knockdown'u* için yaygın olarak kullanılmaktadır [48]. Bu enzimlerin gen ifadelerinin ortadan kaldırılması anlamına gelen bu yöntem deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır ve yapılan çalışmalarda CSE, CBS ve 3-MST *knockout* hayvanlarda büyüme geriliği, anksiyete, nörotransmitter seviyelerinde değişiklik, ateroskleroz gelişimi [43, 55], endotel bağımlı vazorelaksasyonun azalması, hipertansiyon, akut pankreatit [43], renal I/R [56] gibi patolojilerin meydana geldiği gösterilmiştir.

Solüsyonlar ve biyolojik sistemlerden H_2S inhibisyonu, aynı zamanda kimyasallar tarafından da gerçekleştirilmektedir. Deneylerde bu amaçla kullanılan iki ajan vardır: hemoglobin ve hidroksikobalamin. Ancak hemoglobin ve hidroksikobalamin aynı zamanda NO'ya bağlanıp biyolojik aktivitesini azalttığından çok tercih edilen ajanlar arasında yer almamaktadırlar.

H_2S enzim inhibitörleri deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan ve ticari olarak uygun kimyasallar olarak bilinmektedir. Bunlardan beta-siyano-L-alanin (BCA) geri dönüşümlü CSE inhibitörüdür. Propargilglisin (PAG) ise CSE inhibitörü olarak bilinmektedir. Ancak PAG'ın sadece L-izoformu CSE'ı inhibe etmektedir. D-PAG metabolize edilmekte ve in vivo koşullarda bileşiğin toksisite oluşturmasına sebep olmaktadır. Hem PAG hem de BCA sınırlı bir potens ve membran permeabilitesi sergilerler ve yüksek konsantrasyonlarda (nM) kullanılırlar [48]. CSE inhibisyonunda BCA ve PAG karşılaştırıldığında IC_{50} değerlerine göre BCA'in (IC_{50}=14mM) PAG'den (IC_{50}=40mM) daha etkili bir inhibitör olduğu gösterilmiştir. L-aminoetoksivinilglisin (AVG) spesifik CSE inhibitörü olarak bilinmektedir ve diğer inhibitörler ile kıyaslandığında en potent inhibitördür [57]. BCA, PAG ve AVG-bağımlı inhibisyon PLP'ı bloke etmektedir. Bununla birlikte, bu inhibitörlerin CAT gibi diğer vitamin B_6 bağımlı enzimleri de bloke ettiği gösterilmiştir (Tablo 3) [48].

Selektif CBS inhibitörü olarak bilinen aminooksiasetik asitin (AOAA), aynı zamanda CSE enzimini de inhibe ettiği gösterilmiştir. Aslında AOAA, CSE inhibisyonunda CBS'dan daha etkilidir. Dolayısıyla AOAA'nın CBS/CSE'ın ikili inhibisyonunda etkili bir şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir. PAG ve BCA gibi AOAA da PLP-bağımlı enzimlerin katalitik etkilerini engellemektedir [48]. Hem CBS hem de CSE enzimlerinin etkilerini bloke eden bir diğer inhibitör ise hidroksilamindir. Bu inhibitörün aynı zamanda NO üretimine katkı sağladığı bilinmektedir [46]. CBS enziminin selektif inhibisyonu siRNA veya genetik methodlar ile de gerçekleşmektedir. Son zamanlarda selektif CBS inhibitörleri için aday hedef çalışmaları yapılmaktadır (Tablo 3) [48].

3-MST enziminin selektif inhibitörleri henüz keşfedilmemiştir. Deneysel çalışmalarda in vitro ortamda, 3-MP aracılığıyla H_2S üretimini inhibe etmek için, α-ketobütirat, α-glutarat ve pirüvat kullanılmaktadır (Tablo 3) [39, 46, 48].

Tablo 3. H_2S Enzim İnhibitörleri

İnhibe Ettiği Enzim	**İnhibitörü**
CSE İnhibitörleri	Beta-siyano-L-alanin
	Propargilglisin
	Trifloroalanin
	Aminoetoksivinilglisin
CBS + CSE İnhibitörleri	Aminooksiasetik asit
	Hidroksilamin
3-MST İnhibitörleri	α-ketobütirat
	α-glutarat
	Pirüvat

2.2.5. H_2S'ün Fizyolojik ve Patofizyolojik Fonksiyonları

H_2S üretimini sağlayan enzimlerin kardiyovasküler, nöronal, immün, renal, solunum, gastrointestinal, ürogenital ve endokrin sistemlerde eksprese edilmesinin keşfinin ardından, H_2S'ün bu sistemler üzerinde önemli fizyolojik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, H_2S'ün hipertansiyon, ateroskleroz, kalp yetmezliği, diabet, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, ED, metS ve astım gibi patolojik rahatsızlıklarda rol oynadığı ve yeni bir terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir [58].

2.2.5.1. H_2S'ün Kardiyovasküler Etkileri

H_2S kardiyovasküler fonksiyonlar için önemli bir modülatör olarak bilinmektedir. H_2S kan basıncının homeostatik regülasyonu üzerinde kritik rol oynamaktadır. H_2S'ün vasküler tonusu modüle ettiği, kalpte kronotropik ve inotropik regülasyonda rol oynadığı, vazorelaksasyonu indüklediği, vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve vasküler endotelyal hücre proliferasyonunu stimüle ettiği kardiyovasküler sistem üzerinde bilinen etkileridir [38].

Sıçan kalbi üzerinde yapılan çalışmalarda H_2S'ün negatif intropik etki gösterdiği bildirilmiştir. Kalp kontraktilitesi üzerine H_2S'ün inhibitör etkisi çeşitli mekanizmalar tarafından gösterilmiştir. Bu mekanizmalar, K^+_{ATP} kanallarının açılması, AC/cAMP yolağının inhibe edilmesiyle β-adrenoreseptör sistemin baskılanması ve böylece negatif inotropik etkinin oluşması ve kalp kontraktilitesi ile kardiyak ritmin kontrolünde önemli bir role sahip olan L-tipi Ca^{2+} kanallarının akımının azaltılmasıdır [59-61].

Vasküler doku üzerinde H_2S'ün biyolojik fonksiyonu bifaziktir. H_2S'ün yüksek konsantrasyon aralığında (NaHS 100-1600μM) gevşeme yanıtına aracılık ederken, düşük konsantrasyonlarda (NaHS 10-100μM) konsantrasyon bağımlı olarak kasılma yanıtına sebep olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. H_2S'ün gevşetici etkisi, membran hiperpolarizasyonuna yol açan K^+_{ATP} kanallarının açılması ile gerçekleşmektedir. H_2S aynı zamanda hücre içine Ca^{2+} girişini de engelleyerek vasküler doku gevşemesine neden olmaktadır [38, 59].

H_2S'ün vazodilatör etkisi torasik aorta, mezenterik arter, pulmoner arter ve diğer vasküler dokularda bildirilmiştir. H_2S-aracılı gevşeme yanıtları temelde K^+_{ATP} kanallarının açılması ile gerçekleşirken, endotel-bağımlı mekanizmalar da bu vazodilatasyona kısmen aracılık ederler. Diğer sinyal mekanizmaları ise, intrasellüler ATP düzeylerinin azalması, cGMP/PKG yolağının aktivasyonudur [59].

H_2S'ün anjiyogenez ve hücre büyümesini desteklediği son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte gösterilmiştir. H_2S endotel hücrelerinde hücre migrasyonu, büyümesi ve gelişimini arttımaktadır. Hipoksik koşullar altında, H_2S-aracılı anjiyogenez, hipoksi-kaynaklı faktör (HIF)-1α/vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) tarafından meydana gelir [59]. Aynı zamanda H_2S'ün anjiyogenezdeki etkisinin PDE5 inhibisyonu aracılığıyla da gerçekleştirdiğini araştıran bir çalışmada, eksojen NaHS uygulamasıyla cGMP düzeylerinin arttığı, bunun da fosfodiesteraz aktivitesinin engellenmesi yoluyla gerçekleştirdiğini göstermişlerdir [62].

H_2S'ün vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Vasküler düz kas hücre kültüründe, eksojen H_2S mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı yoluyla doz bağımlı şekilde vasküler düz kas hücre proliferasyonu baskılanmıştır. Özellikle, endojen H_2S hücre proliferasyonu oranını zayıflattığı ve apoptozis oranını arttırdığı gösterilmiştir. Bu etki hem MAPK hem de kaspaz-3 proteinlerinin aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir. Bu nedenle, H_2S sadece vazorelaksan olarak değil, aynı zamanda da hücre büyümesi regülatörü olarak bilinmektedir [38].

H_2S, hipertansiyon, ateroskleroz, pulmonar hipertansiyon, şok ve miyokard hasarı gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patogenezi üzerinde regülatör etki göstermektedir. Sistemik ve pulmoner hipertansiyon hayvan modellerinde H_2S eksikliği gözlemlenmiştir. H_2S'ün aynı zamanda iskemik miyokard ve septik şok üzerinde kardiyoprotektif etkileri tanımlanmıştır. Genellikle, bu hastalıkların şiddeti H_2S düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. H_2S üretimi veya metabolizmasında meydana gelen bir fonksiyon bozukluğu ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimi arasında bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür [38].

Hipertansiyon gelişimi gözlenen hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, eksojen H_2S uygulamasının (NaHS ve GYY4137) kan basıncını anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Ancak, kliniğe yansımış H_2S tabanlı bir tedavi uygulaması henüz hayata geçmemiştir [63].

Kalp yetmezliği olan farelerde, oral SG-1002 (H_2S donörü) tedavisiyle CSE/H_2S yolağının kalp yetmezliğinde kardiyak fonksiyonları korumada kritik bir öneme sahip olduğunu gösterilmiştir [64]. Klinikte yapılan bir gözlemsel çalışmada, koroner arter hastalığı (KAH) olan hastaların plazma H_2S konsantrasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir ve böylece düşük plazma H_2S düzeylerinin KAH şiddeti ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [65].

İskemik koşullar altında, kalpte, hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda, CSE aktivitesinin ve mRNA gen ekspresyonunun *downregule* olduğu ve dolayısıyla da endojen H_2S üretimi azaldığı gösterilmiştir. H_2S, I/R hasarı sonrasında apoptozis gelişimini inhibe etmektedir. Bu inhibisyonu pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak gerçekleştirmektedir. Bu bulgular H_2S'ün iskemik kalp hastalıklarında potensiyel bir biyomarker olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür [59].

H_2S'ün hem vasküler yataklarda hem de plazmada ateroskleroz gelişimini anlamlı olarak azalttığı öne sürülmüştür. CSE/H_2S yolağının ateroskleroza karşı koruma için önemli bir terapötik hedef olabileceğini öne süren bir çalışmada, ateroskleroz modeli oluşturulan CSE-knockout farelere, 12 hafta boyunca NaHS tedavisi uygulanmış ve sonucunda ateroskleroz gelişiminin inhibe edildiği gösterilmiştir [55].

2.2.5.2. H_2S'ün Erektil Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Ereksiyon fizyolojisinde rolü olduğu gösterilen diğer bir gazotransmiter de H_2S'dür. H_2S de NO gibi kardiyovasküler homeostaziyi düzenleyen fizyolojik bir regülatör olarak tanımlanmıştır [27].

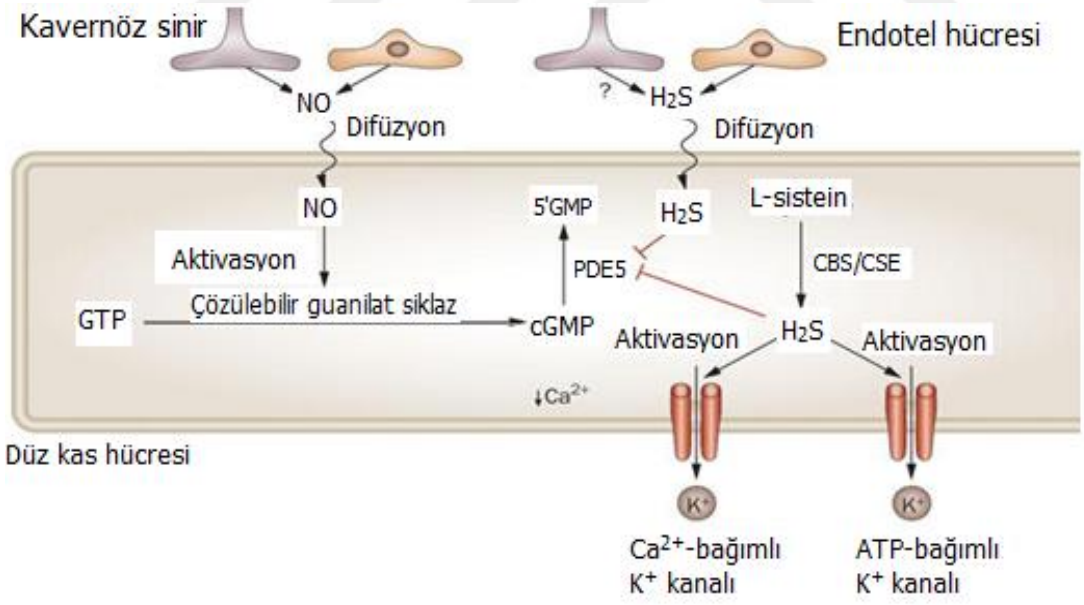
H_2S'ün erektil fonksiyonundaki potansiyel rolü, ilk olarak 2006 yılında Srilatha ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmayla tanımlanmıştır. Bu çalışmada primatlarda

intrakavernozal NaHS enjeksiyonunun penis uzunluğu ve kavernöz basınçta anlamlı olarak artış gösterdiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada sıçanlarda ise, spesifik CSE enzim inhibitörü olan PAG uygulamasının kavernöz sinir stimülasyonu ile uyarılmış perfüzyon basıncı anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuç pro-erektil yolakta PAG'ın inhibitör etkisi ile desteklenmiştir [66].

2009 yılında yapılan bir çalışmada insan korpus kavernozum dokusunda L-sistein/H_2S yolağının varlığı açıkça gösterilmiştir. Özellikle, insan korpus kavernozum homojenatlarında CBS ve CSE enzimlerinin varlığı ve etkili bir şekilde L-sistein'den H_2S üretimi gerçekleştirdiği belirtilmiştir. CBS ve CSE enzimleri penil arterin düz kas hücreleri ve kas trabeküllerinde lokalizedir. Diğer yandan, CSE periferal sinirlerde eksprese edilmektedir. Dahası aynı çalışmada, insan korpus kavernozum şeritlerinde L-sistein ve NaHS'in konsantrasyon bağımlı gevşemeye yol açtığı gösterilmiştir. NaHS'i gevşetici etkisi nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME, NO inhibitörü) inkübasyonunun ardından azaldığı, glibenklamid (K_{ATP} kanalı inhibitörü) ile de inhibe edildiği gösterilmiştr. L-sistein'in gevşetici etkisi ise AOAA tarafından inhibe edilmiştir. Erektil fonksiyonlarında bu yolağın rolü sıçanlar üzerinde in vivo olarak da doğrulanmıştır. NaHS ve L-sistein intrakavernöz enjeksiyonu ardından anlamlı olarak İKB artışı görülmüş ve L-sistein cevaplarının PAG tarafından bloke edildiği gösterilmiştir. Sıçanlarda H_2S'ün penil ereksiyonda doğal bir mediyatör olduğu gösterilmiştir. Bu gözlemlerin H_2S'ün insan penil ereksiyon patofizyolojisi altında yatan kompleks mekanizmaların açığa çıkarılmasına yardım ettiği ve ED ve seksüel uyarılma bozukluğu tedavisinde yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesine katkıda bulunmasına yol açabileceği düşünülmektedir [10]. Ancak hali hazırda patofizyolojik koşullarda H_2S'ün artışının veya azalmasının ED'a katkısını araştıran çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada, tavşan korpus kavernozumunda in vitro olarak H_2S-salınımı yapan sildenafil (ACS6), sildenafil ve NaHS'in gevşeme yanıtları üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bulgulara göre, ACS6 ve sildenafilin doz-bağımlı gevşeme yanıtı oluşturduğu, NaHS'in ise 100μM konsantrasyona kadar etki göstermediği, 100μM'dan yüksek konsantrasyonlarda ise gevşeme yanıtlarına aracılık ettiği ancak ACS6'nın NaHS'ten daha etkili olduğu gösterilmiştir. Sonuçta H_2S-salınımı

yapan ACS6'nın ED tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür [67].

Endotel ve korpus kavernozum düz kas hücrelerinde H_2S ve NO arasında karşılıklı bir etkileşim olduğu varsayılmaktadır. Bu işbirliği, hücresel yanıt olan vazorelaksasyona aracılık etmektedir. Endotel hücrelerinde, asetilkolin M_3 reseptörüne bağlandığında, hücre içi Ca^{2+} artışına bağımlı olarak hem eNOS hem de CSE enzimleri aktive olarak, sırasıyla NO ve H_2S sentezi meydana gelmektedir. Endotelde H_2S'ün PI3-kinaz/Akt/eNOS yolağının aktive olmasına aracılık ettiği düşünülmektedir. Düz kas hücrelerinde ise, cGMP'yi hidrolize edip gevşeme yanıtlarını önleyerek detümesansın başlamasına aracılık eden enzim olan PDE5 enzimini inhibe ettiği düşünülen H_2S'ün hücre içi cGMP'yi arttırarak vazorelaksasyona yardımcı olduğu söylenmektedir. Aynı zamanda eksojen H2S düz kas hücrelesine diffüze olduktan sonra Ca^{2+}-bağımlı veya K^+_{ATP} kanallarını aktive ederek gevşeme sağladığı, dolayısıyla da penil ereksiyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Şekil 4) [9, 27].



Şekil 4. Düz kas hücresinde H_2S ve NO yolakları [27]

2.2.5.3. H_2S'ün Endokrin Etkileri

H_2S pankreatik yapı, fonksiyon ve regülasyonunda önemli bir endojen regülatör olarak bilinmektedir. Pankreas adacıklarında H_2S üreten temel enzim CSE enzimidir. Pankreatik adacıklardan salınan insülin, glukoz metabolizmasının homeostatik kontrolünde ve diabet de dahil olmak üzere insülin rezistansı gelişiminde önemli bir olaydır [38].

Pankreatik K^+_{ATP} kanalları insülin sekresyonu modülasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Artmış glukoz konsantrasyonu hücrede ATP birikimine, K^+_{ATP} kanal blokajına, plazma membran depolarizasyonuna, Ca^{2+} girişine ve insülin sekresyonuna neden olur. INS-1E (pankreatik insülinoma hücre hattı) kültüründe, eksojen H_2S, glukozla uyarılan insülin salınımını K^+_{ATP} kanal açılması aracılığıyla inhibe etmektedir. Böylelikle H_2S'ün K^+_{ATP} kanallarını aktive ederek pankreatik insülin salınımını inhibe edebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, hücre apoptozisine bağlı olarak H_2S, insülin üretiminin azalmasına yol açan pankreatik β hücre kitlesini azaltabilir. Pankreatik H_2S'ün bu etkisi, glukoz homeostatik regülasyonla birlikte pankreatik insülin metabolizmasının homeostatik kontrolü için aday mekanizmaları temsil edebileceği öne sürülmüştür. Özellikle pankreasta değişmiş H_2S metabolizması diabet patogeneziyle yakından ilişkilidir [38, 40, 58].

Endojen H_2S insülin sekresyonunu inhibe ederek, glukoz üretimini azaltmaktadır. Diğer bir deyişle, H_2S *downregülasyonu* glukozla uyarılan insülin sekresyonuna yol açmaktadır. H_2S glukoz metabolizması ve ATP üretimini inhibisyonunda rol oynamaktadır. H_2S'ün aşırı üretimi insülin sekresyonunda bozulmaya yol açtığı öne sürülmüştür [40].

H_2S kaynaklı insülin salınımının inhibisyonu büyük oranda β hücrelerindeki K^+_{ATP} kanallarının stimülasyonu ile ilişkilidir. Bu inhibisyon INS-1E ve HIT-T15 (insülin-salgılayan hücre hattı) hücre hatlarında gösterilmiştir. INS-1E hücrelerinde, 300μM konsantrasyona kadar eksojen H_2S uygulamasında, K^+_{ATP} kanalları üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir. Ancak, PAG varlığında 100μM ve altındaki H_2S konsantrasyonlarında K^+_{ATP} kanallarının aktive edildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar,

INS-1E hücrelerindeki K^+_{ATP} kanallarının zaten endojen H_2S tarafından tam anlamıyla stimüle edildiği, böylece bazal kanal aktivitesinin muhafaza edildiğini göstermektedir. CSE gen ekspresyonunun inhibe edilmesi durumunda, endojen H_2S düzeyleri anlamlı olarak azaldığından dolayı, K^+_{ATP} kanalları eksojen H_2S stimülasyonu ile onarılmıştır [58].

CSE-H_2S sistemi β-hücre fonksiyon regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. H_2S tip 2 diabette glukoz geri alım mekanizmasını ve insülin duyarlılığı oluşumunu destekler. Yapılan bir in vitro çalışmada, H_2S'ün adipositlerde glukoz alımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu etki, insülin reseptör, PI3kinaz ve Akt fosforilasyonunun upregüle edilmesi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Goto-Kakizaki diabetik sıçanlarda, kronik NaHS tedavisinin (30μmol/kg/gün) açlık kan glukozunu azalttığı, insülin duyarlılığını arttırdığı ve kaslarda PI3kinaz ve Akt fosforilasyonunu arttırarak glukoz toleransını arttırdığı gösterilmiştir. NaHS tedavisi sonucu gözlenen etkiler Wistar türü sıçanlarda da benzer sonuçları vermiştir. Bu sonuçlar H_2S'ün, insülin rezistansına karşı yeni bir terapötik hedef olma konusunda umut vaat ettiğini göstermektedir [58, 68].

Streptozotosin-kaynaklı diabet sıçan modelinde, plazma H_2S düzeyleri değişmezken, pankreas ve karaciğerde H_2S üretiminin arttığı gösterilmiştir. Pankreastaki CBS ekspresyonu diabetik grupta anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ve insülin tedavisi ile tedavi sağlanmıştır. Bu çalışmanın aksine, tip 1 diabet fare modelinde H_2S biyosentezinin azaldığı gösterilmiştir. Yapılan birçok çalışmada, H_2S donörlerinin eksojen uygulamasının pankreatik β hücrelerinde insülin salınımını inhibe ettiği ve H_2S'ün glukoz metabolizmasını bozduğu ve insülin salınımının inhibisyonu ile diabet patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir [40, 68]. NOD (non-obez diabetik) farelerde diabetik patolojinin H_2S üretimine etkisi değerlendirilmiştir. Hastalık şiddeti ile paralel olarak H_2S'ün plazma ve aortadaki düzeylerinde azalma meydana gelmiştir. Organ banyosu çalışmasında aortada L-sistein bağımlı vazodilatasyonun anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Endojen H_2S üretimi hiperglisemik NOD farelerde anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir [69]. Streptozotosin ile indüklenen diabetik sıçanlarda, plazmada H_2S düzeylerinin azaldığı, in vivo intrakavernoz basınçlarda azalma meydana geldiği, korpus kavernozumda ise CBS ve CSE ekspresyonlarının

azaldığı gösterilmiştir. H_2S sinyal yolağının hiperglisemi kaynaklı ED ile ilgili olabileceği düşünülmektedir [70].

2.3. Erektil Disfonksiyon

Ereksiyon fizyolojisi korpus kavernozum düz kas hücrelerinde vazodilatasyon (tümesans) ve/veya kontraksiyonun azalması (detümesans) ile sonuçlanan vasküler, nörolojik ve endokrin faktörlerin etkileşimidir. Bu sistemlerin herhangi birinde gerçekleşen bir aksaklık sonucu ereksiyon gerçekleşmez ve bu durum multifaktöriyel bir hastalık olan erektil disfonksiyon oluşumuna neden olabilir [28]. Yaklaşık 15 yıl öncesine kadar bu durumu tanımlamak için kullanılan bir terim 'iktidarsızlık' olmuştur. Ancak günümüzde bu patolojik durum daha açıklayıcı bir terim olan 'erektil disfonksiyon (ED)' adıyla tanımlanmaktadır. ADB Ulusal Sağlık Enstitüsü ED'u tatmin edici cinsel ilişki için ereksiyonun başlaması ve sürdürülmesinde yetersizlik olarak tanımlamıştır [27]. ED, 40-70 yaş grubundaki erkeklerin yaklaşık %50'sini etkilemekte olup, dünya genelinde yaklaşık 150 milyon erkeğin ED hastası olduğu söylenebilir [12].

Seksüel birleşme için yeterli ereksiyona ulaşamama veya yeterli sürede ereksiyonu sürdürememe olarak tanımlanan ED, organik, psikojenik veya organik ve psikolojik etmenlerin etkileşimi olan karma ED olarak sınıflandırılmıştır [71, 72]. En yaygın formu olan organik ED, eğer travmatik değilse, penil vasküler sistemindeki anormal fonksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Organik ED'nin birincil sebebi olarak yaşlanma olarak gösterilmiştir, bunun dışındaki nedenleri arasında vasküler, hormonal, nörojenik nedenler ve penil hasar sayılabilir [71]. Psikojenik ED ise, depresyon, performans anksiyetesi, ilişki problemleri, psikososyal problemler gibi psikolojik nedenlerden dolayı görüldüğü bilinmektedir.

ED dünyada erkeklerin önemli bir kısmını etkileyen ve yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etkilere sahip yaygın bir klinik durumdur. Bütün epidemiyolojik çalışmalarda açıkça ED'un yaşa bağlı olarak prevalansının ve şiddetinin arttığı gösterilmiştir. ED popülasyonda prevalansı %30 ile %50 arasında tahmin edilen ve giderek yaygınlaşan bir durumdur. 40-70 yaşları arasındaki Amerikan erkeklerinde, %52 oranında veya 18

milyon civarında çeşitli derecelerdeki ED'den etkilendiği gösterilmiştir. Massachusetts Erkek Yaşlanma Çalışması (MMAS) verilerine göre, ED görülme olasılığının 40 yaşındaki erkeklerde %5, 70 yaşındaki erkeklerde %15 oranında görüldüğü ve yaşa bağlı olarak 3 katına kadar çıkabileceği belgelenmiştir. Avrupa Erkek Yaşlanma çalışmasında ise, 40-49 yaşları arasındaki erkeklerde ED prevalansının 70 yaş ve üzeri yaş grubunda en yüksek oranda görüldüğü bildirilmiştir [73].

ED dünya çapında giderek büyüyen bir sorun haline gelmiştir ve ABD'de yaklaşık 30 milyon erkeğin bu hastalığa sahip olduğu bilinmektedir. ED etiyolojisi nöronal, vasküler ve hormonal komponentleri içermektedir ve multifaktöriyel bir hastalık olarak bilinmektedir. KAH'na sahip insanlarda ED semptomlarının insidansı artmaktadır. KAH ve ED, MetS'un da komponentlerini oluşturan hipertansiyon, diabet, sigara kullanımı, hiperkolestrolemi gibi ortak risk faktörleri içermektedirler. Dolayısıyla ED kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde erken dönem bulgusu kabul edilmektedir. Bu nedenlerden dolayı ED'un MetS hastalıkları teşhisinde iyi bir gösterge olabileceği düşünülmektedir [72].

Bugüne kadar ED tedavisinin temeli, NO/cGMP yolağının modüle edilmesine dayanan PDE5 inhibitörleri (PDE5i) olarak görülmekteydi. PDE5i cGMP etkisini uzatarak ve böylece erektil fonksiyonları arttırarak etkisini göstermektedir. Ancak %40'tan fazla ED hastasının NO biyoyararlanımının bozulmasıyla PDE5i tedavisine yanıtsız kaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [34].

2.4. Metabolik Sendrom

İlk olarak 1920'lerde tanımlanan metS, hipertansiyon, gut ve hipergliseminin bir arada görüldüğü bir hastalık olarak tanımlanmıştır. 1988 yılında ise Reaven, insülin rezistansı sendromu olarak adlandırdığı bu hastalığı ateroskleroz için önemli risk faktörü olarak tanımlamıştır. Aynı zamanda metS'un kardiyovasküler hastalıklarla bağlantılı ciddi kronik hastalıklar ve tip 2 diabetten orijinlendiğini göstererek insülin rezistansı kavramını genişletmiştir [74]. 1998 yılında ise Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından bu sendromun diabet ve komplikasyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

MetS aynı zamanda insülin rezistansı sendromu, sendrom X ve kardiyometabolik sendrom gibi farklı terimlerde de kullanılmaktadır [73].

MetS, abdominal obezite, yüksek kan basıncı, hiperglisemi, dislipidemi, insülin rezistansı ve glukoz intoleransı gibi metabolik anomali topluluğundan oluşan ve birçok klinik durumda tip 2 diabet ve vasküler patolojilerle ile ilişkilendirilen progresif bir hastalıktır [72, 75]. Uluslararası Diabet Federasyonu, DSÖ, Avrupa Grubu İnsülin Rezistansı Çalışması, Amerikan Kalp Derneği, Yetişkin Tedavi Paneli III (ATP III) ve ABD Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP) gibi kuruşlar farklı kombinasyonlardan oluşan MetS tanı kriterlerini tanımlamışlardır. NCEP-ATP III tarafından tanımlanan metS kriterlerine göre kişide (i)abdominal obezite (bel çevresi erkeklerde>102cm kadınlarda>88cm), (ii)hipertrigliseridemi (≥150mg/dL), (iii)düşük HDL (erkeklerde<40mg/dL, kadınlarda <50mg/dL), (iv)hiperglisemi (açlık kan glukozu≥110mg/dL), (v)hipertansiyon (kan basıncı≥130/85mm Hg, sayılan bu faktörlerden en az üçünün bulunduğu takdirde metS tanısı koyulabilir. DSÖ'nün tanımladığı metS tanı kriterlerine göre ise, kişide insülin rezistansı varlığında; artmış yüksek bel çevresi oranı, trigliserit düzeylerinin yüksek veya HDL kolesterol konsantrasyonun düşük olması, kan basıncı artışı gibi faktörlerin en az ikisini karşılıyorsa metS tanısı koyulabilir [72, 73, 76].

Dünya genelinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda metS prevalansının önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. MetS sıklığı, ilerleyen yaş ve vücut ağırlığı artışıyla artmaktadır ve aynı zamanda incelenen toplumlara göre değişkenlik göstermektedir. ABD'de metS %35-39 oranında görülürken, bu oran Avrupa'da %9.5'tir (3). Ülkemizde 2000 yılında yapılan TEKHARF çalışmasına göre, Türkiye genelinde 30 yaş ve üzerindeki 9.2 milyon kişide metS mevcuttur ve KAH geliştiren bireylerin % 53'ü aynı zamanda metS hastasıdır. Ülkemizde metS görülme sıklığı, erkeklerde % 28, kadınlarda ise % 40'tır. 2004 yılında yapılan METSAR (Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması) sonuçlarına göre 20 yaş ve üzerindeki erişkinlerde metS sıklığı %35 olarak saptanmıştır. Bu araştırmada kadınlarda metS sıklığı erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur (kadınlarda % 41.1, erkeklerde % 28.8) [77, 78].

MetS, vasküler hastalıklarda rol oynayan endotelyal disfonksiyona ve sonuçta da ED ile sonuçlanan bozukluklara sebep olmaktadır. Endotelyal disfonksiyon, vazodilatasyonun bozulması ile sonuçlanan vasküler NO düzeylerinin azalmasına ve aterosklerotik hasara neden olan serbest radikal konsantrasyonunun artmasına yol açmaktadır. Bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda, MetS'un ED için güçlü bir risk faktörü olduğu ve bunun yanısıra ED'un kardiyovasküler hastalıkların habercisi olabileceği gösterilmiştir [14]. MetS hastalarında ED'un iki kat daha fazla görüldüğü gösterilmiştir. MetS-ED arasındaki ilişki daha çok klinik ve epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konmuştur [24]. Ülkemizde MetS tanısı alan 236 erkekle yapılan bir klinik çalışmada %96,5'inda ED, %39,6'sında cinsel isteksizlik, %22,7'sinde erken boşalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada azalmış ereksiyon fonksiyon skoru ile artmış metabolik risk faktörleri arasında güçlü korelasyon gösterilmiştir [18]. Aynı araştırma grubu bir başka çalışmalarında MetS'lu hastalarda penil doplerle yapılan ölçümlerle ED ile MetS ilişkisini ortaya koymuşlardır [19]. MetS'da ED mekanizmalarını araştıran deneysel çalışmalara bakıldığında genetik olarak obez olan sıçanların penil dokularında NO sentezinden sorumlu olan nNOS ve eNOS expresyonunun ve aktivitesinin değiştiği [20], rhoA/rhokinaz yolak etkinliğinin arttığı [20, 21], insüline bağlı gevşeme yanıtlarının bozulduğu, penil arterde MAPK inhibitörü varlığında insülin yanıtlarının arttığı bildirilmektedir [22]. Yine obez sıçan penil arterinde nöronal ve endotelyal gevşeme yanıtlarının bozulduğu NADPH oksidaz inhibitörü varlığında ve eNOS kofaktörü BH_4 eklendiğinde bu yanıtların düzeldiği gösterilmiştir [23]. Tip 2 diyabet oluşturulan sıçanlarda erektil fonksiyonların bozulduğu buna NO yolağındaki hasarın veya kalsiyum duyarlılığını arttırarak düz kas kasılmasından sorumlu bir yolak olan RhoA/Rhokinaz yolağının aktivitesinin artmasının neden olduğu bildirilmektedir [79]. Yüksek yağ oranlı diyet ile beslenen sıçanlarda erektil fonksiyonların bozulduğu [24, 25], rhoA/rhokinaz yolağı ve eNOS ekspresyonunun azaldığı [25], tavşanlarda ise korpus kavernozumda düz kas/fibröz doku oranının arttığı bildirilmektedir [26]. ED için birçok risk faktörünün bir araya gelmesiyle oluşmuş olan MetS'da görülen ED tedavisine yönelik henüz bir yol kat edilmemiştir. Patolojinin gelişmesini önlemekten çok fonksiyonu arttırmaya yönelik olarak kullanılan PDE5 inhibitörleri pek çok hastada yetersiz kalmaktadır. Bu konuda yeni ilaçların gelişimine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.1. Erektil Fonksiyonların Değerlendirildiği MetS Modelleri

ED'un MetS'da yüksek oranda görülmesi ve erken dönem bulgusu olmasından dolayı mekanizmasını açıklamaya yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır. Ancak literatürde MetS-ED ilişkisini ortaya koyan klinik çalışmaların olmasına rağmen tedavi hedeflerini araştırmaya yönelik deneysel çalışmalar hem az sayıdadır [24]. Deneysel çalışmalar ve klinik araştırmalar yüksek yağ ve şeker tüketimine bağlı olarak uzun vadede diabet gelişimi ve ilgili metabolik ve kardiyovasküler hastalıkların görülme oranının arttığını göstermektedir [80].

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda yüksek yağ veya yüksek fruktoz tüketimine bağlı ve aynı zamanda genetik temelli modeller üzerinde metS modelleri kullanılmıştır. Fruktoz ile oluşturulan MetS modeli insanda görülen MetS'a en yakın modellerden biridir. Bu modelin önemli olmasının nedenlerinden biri mısırdan yapılan ve yüksek miktarda fruktoz içeren mısır şurubunun tüm dünyada kullanımının yaygınlaşması, alınan total kalori miktarında artışa ve MetS görülme sıklığında artışa yol açmasıdır [81, 82]. 1986 ile 2007 yılları arasında kişi başı ortalama fruktoz tüketimi ortalama %16 artmıştır. Son 50 yıldır fruktoz tüketimindeki artışla beraber obezite insidansıda artmıştır [81]. Bir diğer nedeni ise MetS anomalilerinin bir çoğunu oluşturuyor olmasıdır. Aşırı miktarda fruktoz alımı karaciğer serbest yağ asitlerinde artışa neden olmakta oluşan serbest yağ asitleri düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) olarak kana salınmakta, dolaşıma katılan fazla miktarda VLDL viseral dokuda ve iskelet kasları etrafında depolanmaktadır. Karaciğer ve viseral dokuda depolanan yağ miktarı IR'na, glukoz toleransında azalmaya sonuç olarak da MetS'a yol açmaktadır. Fruktoz insan vücudunda ürik asit miktarını da yükseltmektedir [83]. Artan ürik asit konsantarsyonu hiperglisemi, hiperinsulinemi, IR ve hipertrigliseridemiye yol açmaktadır [84]. Fruktoz ince barsak ve böbrekte sodyum klorür (NaCl) absorbsiyonuna yol açarak hipertansiyon oluşmasına katkıda bulunmaktadır [85]. Sonuç olarak yüksek fruktozlu diet ile beslenen deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda glukoz intoleransı, insülin rezistansı, hiperinsülinemi ve dislipidemi oluşumu gösterilmiştir. Bu metabolik bozukluklar, genel olarak hem insan hem de

hayvan modellerinde yüksek fruktozlu besleme ile gözlenen insülin direnci oluşumunu tetiklemektedir [86].

ED-MetS ilişkisini değerlendiren deneysel çalışmalarda yüksek yağ diyeti modeli, genetik olarak oluşturulan model (obez zucker), streptozotosin ve yüksek yağ diyetinin birlikte kullanıldığı modeller kullanılmıştır. MetS'a bağlı ED gelişimini değerlendiren bir çalışmada, sıçanlar 12 hafta boyunca yüksek yağlı diet ile beslenmiş ve metS modeli oluşturulmuştur. MetS grubunda değerlendirilen vücut ağırlığı, sistolik kan basıncı, insülin düzeyleri ve HOMA-IR parametrelerinin anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. In vivo erektil yanıtlarda ise metS grubunun İKB/OKB oranında bakıldığında anlamlı olarak azaldığı ve ED gelişimi gösterilmiştir [24].

Yapılan çalışmalar doğrultusunda MetS'a bağlı ED oluşumu gösterilmiş ancak bu patogenezin tedavi değeri üzerinde yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Randomize kontrollü deneysel araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Mayıs 2015-Mayıs 2016 tarihleri arasında yapılmıştır. In vivo ve in vitro deneyler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarı ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmanın evreni ve örneklemi yoktur.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada 42 adet Wistar türü erkek sıçan kullanılmıştır.

Deney hayvanları Mayıs 2015'te Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir ve çalışma modeli olan metabolik sendrom modeli 10 hafta boyunca burada oluşturulmuştur. 10 haftanın sonunda deney yapılacak sıçanlar çalışma sabahı Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler: Erektil yanıtlar, metabolik sendrom

Bağımsız değişkenler: Hidrojen sülfür, yüksek fruktoz diyeti

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Metabolik Sendrom Modelinin Oluşturulması ve Gruplandırma

Çalışma modeli olan metS modeli 10 hafta süresince Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'nda oluşturulmuştur.

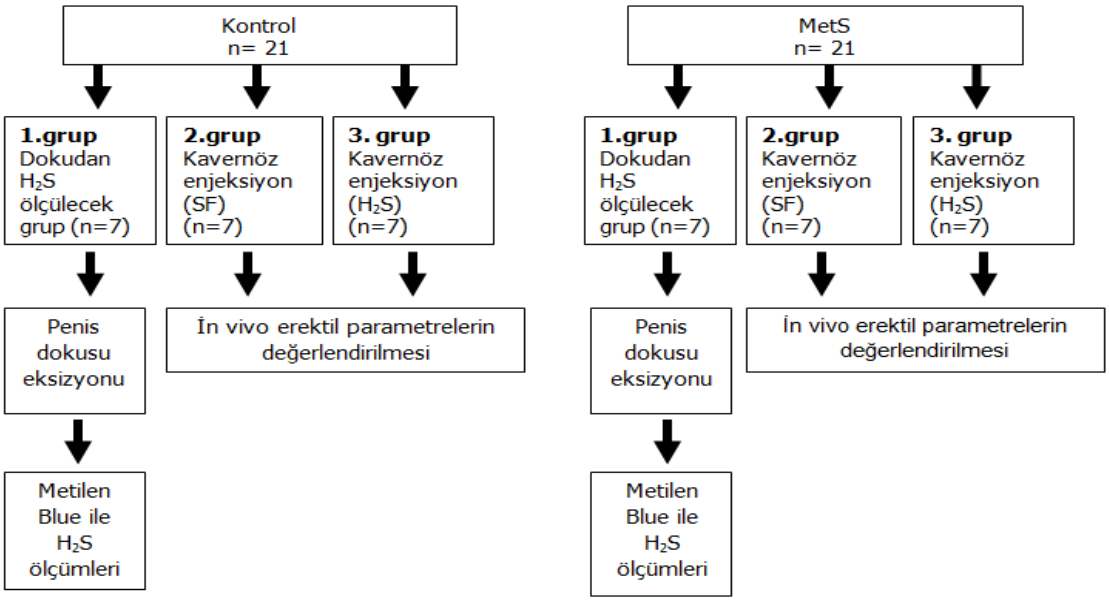
Başlangıç ağırlıkları 200-250g olan sıçanlar randomize olarak iki gruba ayrılmışlardır.

1. Kontrol Grubu: Sıçanlar 10 hafta boyunca standart yem ve su ile beslenmiştir (n=21).
2. MetS Grubu: Sıçanlar metS modeli oluşturmak için 10 hafta %60 fruktoz içeren diyet (Altromin Spezialfutter) ve normal su ile beslenmiştir (n=21) (Şekil 5).



Şekil 5. Deney hayvanlarının barındırıldığı kafesler

10 haftanın sonunda, deney protokolü başlamadan hemen önce kontrol ve metS grupları uygulanacak protokole göre randomize olarak üçer gruba ayrılmışlardır (Şekil 6).



Şekil 6. Deney protokolünün gruplara ve n sayısına göre ayrımını gösteren şema

Çalışmaya alınan tüm sıçanlar standardizasyon amacı ile bir hafta süre ile standart yem ve içme suyu ile beslenerek ortama uyumları sağlanmıştır. Sıçanların beslenme süresi 10 hafta olarak belirlenmiştir. Tüm deney süresi boyunca sıçanlar 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyen ritminde, ortam sıcaklığı 24-26°C'de sabit tutulmuştur. Deney yapılacak hayvanların 12 saat öncesinden yemleri alınmış, sıvı alımlarına ise izin verilmiştir.

3.6.2. Biyokimyasal Analizler

Başlangıç kanları çalışma protokolü başlamadan önce hayvanların kuyruk veninden, bitiş kanları sakrifikasyon işleminden sonra kalplerinden 1 cc kan alınmıştır.

Metabolik değişiklikleri değerlendirmek amacıyla için serum trigliserid, ürik asit, kan glukoz ve insülin değerleri değerlendirilmiştir. Glukoz, trigliserid ve ürik asit değerleri Hitachi 902 otoanalizör cihazı kullanılarak enzimatik yöntemle ölçülmüştür. İnsülin değerleri ise kolorimetrik yönteme dayalı insülin elisa kit (Merck Milipore, Katalog No: EZRMI-13K) ile ARLAB laboratuarının Sinergy HT Biotek cihazı ve Kc4 yazılımı kullanılarak spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır.

3.6.3. Vücut ağırlığı ve Bel Çevresi Ölçümü

Grupların başlangıç ağırlıkları ve bel çevresi/tibia uzunluğu belirlendikten sonra çalışma sonuna kadar 10 hafta boyunca haftada bir ölçümler tekrar edilmiştir.

3.6.4. İnsülin Rezistansı Ölçümü

Ölçülen insulin ve glukoz değerleri HOMA-IR hesaplaması için kullanılmıştır.

HOMA-IR formulasyonu=açlık serum insülin x açlık serum glukoz/22.5 [24].

3.6.5. In vivo İntrakavernöz Basınç Ölçümü

Sıçanlar üretan ve alfa-kloraloz ile anestezi edilmiştir (500 and 50 mg/kg, sırasıyla). Hava yolunun açık tutulması için trakea PE-240 polietilen tüp ile, sistemik arteriyel basınçların ölçülmesi için sol karotis arteri PE-50 tüp ile kanüle edilmiştir. Abdominal orta hat kesisi ile prostat ve mesane eksplore edilmiş (Şekil 7), prostatın posterolateralinde kavernozal sinir bulunup bipolar kanca (Harward Dastre elektrodu USA) ile askıya alınmıştır (Şekil 8).



Şekil 7. Trakea ve karotis kanülasyonu

Penis üzerindeki deri, korpus kavernozumlar açığa çıkacak şekilde diseke edilmiş, intrakavernozal basınç ölçümü için sağ kruraya 25G iğne, sol kruraya ise ilaç enjeksiyonu için 25G iğne yerleştirilmiştir. Hem arteriyel kateterler hem de kavernozal kateterler işlem öncesi 250 U/ml heparinli solüsyondan geçirilmiştir. Sistemik arteriyel ve kavernozal basınçlar sürekli olarak MP30 BPT300 transducer aracığı ile bilgisayarlı bir sistem (MP30 Biopac systems Inc., Santa Barbara California, U.S.A) yardımıyla kaydedilmiştir.



Şekil 8. Penis kanülasyonu ve kavernöz sinir diseksiyonu

Kontrol ve MetS grupları erektil parametlerin değerlendirilmesi için ilaç ve çözücüsünün enjekte edileceği grup olarak her bir grup kendi içinde tekrar iki ayrı gruba ayrılmıştır. Başlangıç aşamasında l-sistein enjeksiyonu olarak planlanan ilaç grubu penil dokuda l-sisteinle uyarılan H_2S miktarı ölçüleceği için, H_2S yolağını daha kapsamlı değerlendireceğimiz donör olan NaHS enjeksiyon grubu olarak değiştirilmiştir. Sonuç olarak ilk grup kavernozal SF enjeksiyonu (n=7); ikinci grup ise kavernozal NaHS enjeksiyonu (n=7) yapılacak grup olarak belirlenmiştir.

Cerrahi işlemleri takiben sıçanlar 15 dk stabilizasyon için bekletilmiş, bu esnada İKB ve OAB bazal değerleri kaydedilmiştir.

Erektil yanıtları değerlendirmek amacıyla 1 dakika boyunca 20 Hz'de 1 milisaniye frekansla 7,5V ile kavernöz sinir uyarılması esnasında İKB ve OAB değerleri kaydedilmiş ve sonrasında maksimum intrakavernozal basınç (maksimum İKB: derin penis arterin maksimum gevşeme kapasitesi)/ortalama arteriyel basınç (OAB), İKB/OAB (penise kan pompalanması esnasındaki korpus kavernozumun maksimum gevşeme kapasitesi) ve eğri altında kalan alan (EAA: kavernozal sinir uyarımı esnasındaki İKB değişiklikleri, ereksiyon kapasitesi) hesaplanmıştır.

Kontrol ve MetS gruplarında SF veya NaHS enjeksiyonu yapılmadan önce, İKB/OAB oranları ile total İKB değerini gösteren EAA hesaplanarak ED oluşumu değerlendirilmiştir.

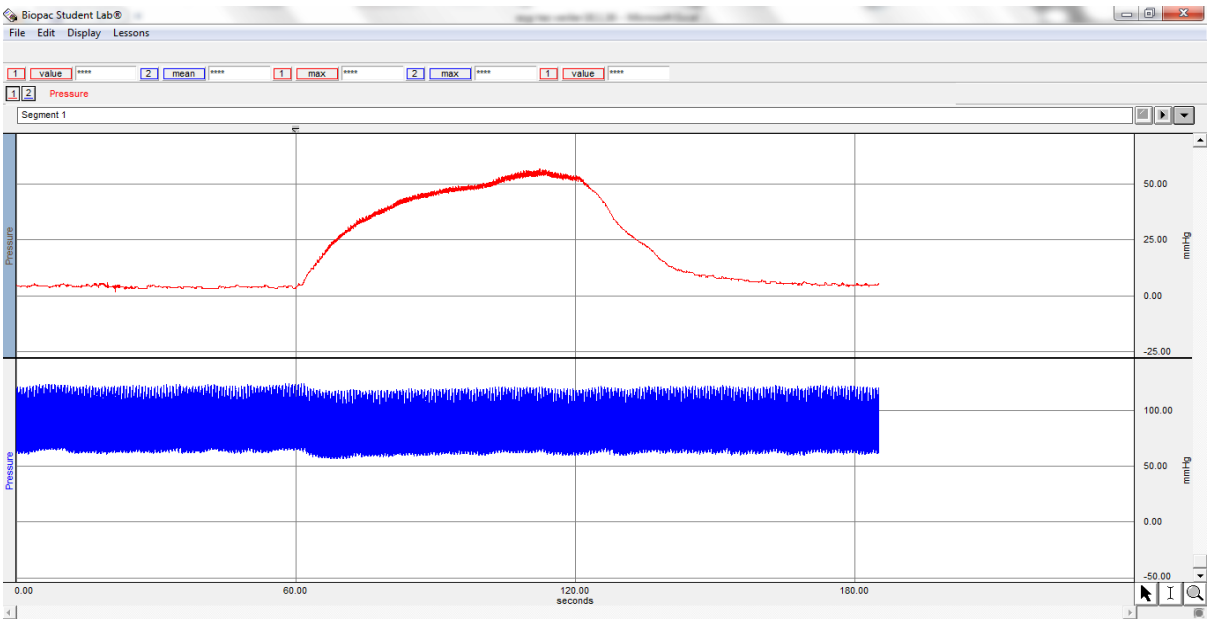
Sonrasında sıçanlar iki gruba ayrılmıştır;

Kavernozal SF enjeksiyonu yapılacak grupta 50µl SF enjeksiyonunun ardından bir dakika bekledikten sonra kavernöz sinir uyarılarak erektil yanıtlar değerlendirilmiştir. Aynı elektriksel uyarı 3. ve 5. dakikalarda da uygulanmış, sonuçlar kaydedilmiştir (Şekil 9).

Kavernozal NaHS enjeksiyonu yapılacak grupta 50µl NaHS (100µg) enjeksiyonunun ardından 1 dakika bekledikten sonra kavernöz sinir uyarılarak erektil yanıtlar değerlendirilmiştir. Aynı elektriksel uyarı 3. ve 5. dakikalarda da uygulanmış,

sonuçlar kaydedilmiştir. 1. ve 5. dakikalarda etki gözlenmediği için sadece 3. dakikadaki ölçümler değerlendirmeye alınmıştır (Şekil 9).

Çalışma sonunda hayvanlar intrakardiak girişimle kanı alınarak sakrifiye edilmiştir. Alınan kanlar biyokimyasal analizler için kullanılmak üzere -20ºC'de saklanmıştır.



Şekil 9. Kavernöz sinir uyarımı sonucu intrakavernöz basınç ve ortalama arteriyal basınç düzeyi

3.6.6. İzole Organ Banyosunda gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi

Pozitif kontrol olarak aortada H_2S bağımlı gevşeme yanıtları değerlendirilerek penil doku ve vasküler yapıdaki H_2S yolağının korelasyonu araştırılmıştır. Bu amaçla organ banyosu sisteminde H_2S'ün metabolik prekürsorü olan L-sistein aracılı gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu ve MetS gruplarından izole edilen eşit olarak 4 mm uzunluğunda parçalara ayrılmış aorta parçaları 5 ml'lik % 95 O_2, % 5 CO_2 karışımıyla sürekli olarak gazlandırılmış 37ºC'de pH'ı 7.4 olan Krebs solüsyonu (mM olarak NaCl 118, KCl 4.8, $CaCl_2$ 2.5, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 24, glikoz 11, $MgSO_4$ 1.2, Na_2EDTA 0.01) içeren DMT marka myografın (Danish Myograph, Danimarka) banyolarına konularak, izometrik olarak aortalara 15 mN öngerilim uygulanmıştır. Daha sonra dokular 90 dakika dinlenme periyoduna bırakılmış dinlenme periyodu boyunca banyo içerisindeki Krebs

solüsyonu 15 dakikalık aralarla değiştirilmiştir. İzometrik gerilimdeki değişiklikler powerlab kayıt sistemi ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Dinlenme periyodu sonunda fenilefrin ile kastırılan aort halkaları üzerine kümülatif olarak L-cystein (10^{-3}-$3x10^{-2}$) uygulanarak yanıtlar değerlendirilmiştir.

3.6.7. Metilen Mavisi Deneyi ile H_2S Ölçümü

Kontrol (n=7) ve MetS (n=7) gruplarındaki penil dokudan H_2S düzeyi ölçülecek grupların penil doku eksizyonları yapılmıştır ve metilen mavisi deneyi yapılana kadar önce sıvı azotta dondurulmuş, ardından -80 ºC'de saklanmıştır.

75-80 mg yaş ağırlığındaki korpus kavernozum dokuları 200 µl hacimde 10^{-1} M potasyum fosfat tamponu (PPB) ile mini potter kullanılarak homojenize edilmiştir. Tamamen toz haline gelen örnekler 40 dakika, +4°C'de rotatörde döndürülüp ardından 10.000 rpm'de, yine +4°C'de, 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve ependorf tüplerden supernatantlar protein miktar tayini için alınmıştır. Bradford yöntemi kullanılarak protein miktar tayini yapılmıştır. Örnekler bir sonraki gün metilen mavisi deneyi için kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Homojenatlar, ependorf tüpte total hacim 200 µl hazırlanıp, bazal ve L-sistein ile stimüle edilmiş olmak üzere iki ayrı örnek grubu oluşturularak H_2S üretimi incelenmiştir.

Tablo 4. Metilen mavisi deneyinde kullanılan kimyasalları hacimleri

Kullanılan miktar (µl)	**PPB**	**Örnek**	**Saline**	**Pridoksal-5'-fosfat**	**L-sistein**
Bazal H_2S	450-V	V	30	20	-
L-sistein'le uyarılmış H_2S	450-(V+50)	V	30	20	50

Eppendorf tüplerde bulunan tüm örneklerin kapakları kapatıldıktan sonra parafilm ile kaplanmıştır. L-sisteinin H_2S'e metabolizasyonu için örnekler 40 dakika,

37°C'deki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince0.1 M PPB dilüsyonu ile 250 µM 125 µM, 62,5 µM, 31,25 µM, 15,6 µM, 7,8 µM, 3,9 µM NaHS konsantrasyonları kullanılarak bir standart eğrisi hazırlanmıştır. Kör olarak PPB kullanılmıştır.

İnkübasyonun ardından tüm örnekler, standartlar ve kör için:

*250 µl %1 çinko asetat (ZnAc) konularak yavaş bir şekilde eppendorf tüp parmaklar arasında sallanmıştır.

*250 µl %10 trikloroasetik asit (TCA) konularak hiçbir sallama hareketi yapılmamıştır.

*133 µl DPD konularak eppendorf tüpler hızlı ve güçlü bir şekilde dik olarak parmaklar arasında sallanmıştır.

*133 µl Demir-III-klorür ($FeCI_3$) konularak hiçbir sallama hareketi yapılmamıştır.

Bütün gruplar 15 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilerek ardından 10.000 rpm, 4° sıcaklıkta 5 dakika santrifüj edilmiştir. Mikroplate'e örnekler, standartlar ve körden 200 µl duplike olarak konulmuş 650 nm'de kolorimetrik spektrofometrede (Thermo Sci., Varioscan flash Type: 3001) her 5 dakikada bir ve son olarak 20. dakikada son ölçüm alınmıştır. 10. dakikadaki sonuçlar en verimli sonucun alındığı zaman olduğu için 10. dakikaya göre Graph Pad Prism'de analiz edilmiştir. Sonuçlar 10. dk'da mg protein başına dakikada üretilen nmol cinsinden H_2S miktarı olarak verilmiştir (nmol[H_2S]/mg protein*dk^{-1}).

3.6.8. Kullanılan Araç, Gereç ve Kimyasallar

Cihazlar

1. İzole organ banyosu sistemi (DMT, Danish myograph, Danimarka)
2. Varioscan Spektrofotometresi (Thermo Sci., Varioscan flash Type: 3001)
3. Spektrofotometre (Sinergy HT Biotek cihazı)

4. MP30 Biopac systems Inc., Santa Barbara California, U.S.A), MP30 BPT300 transdüser, bipolar kanca (Harward Dastre elektrodu USA)
5. Tartı (ACCULAB ACL3100)
6. Hassas terazi (Precisa XB22OA)
7. Vorteks (Heidolph Reax top, Germany)
8. Sıvı nitrojen tankı (AirLiquid GT2)
9. Arçelik No-frost buzdolabı
10. -80°C derin dondurucu (Thermo Scientific Forma Upright Freezer, TF88400V)

Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

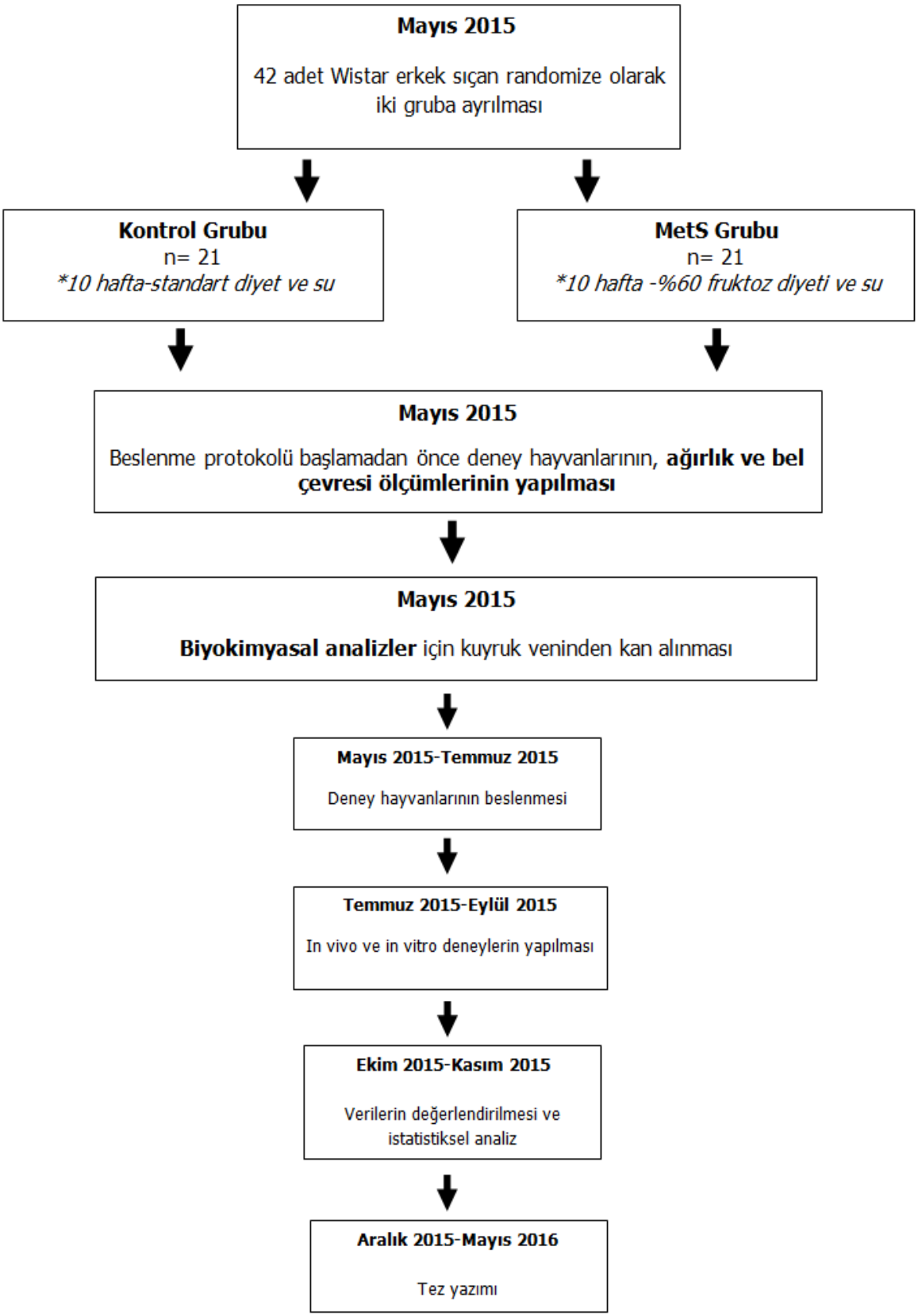
1. Cerrahi aletler
2. Basınç transdüseri (BPT300)
3. *N,N*-dimetil-p-fenilendiamin (DPD) (Sigma, Ürün No: 186384)
4. Demir-III-klorür (FeCl3) (Santa Cruz, Ürün No:sc-215192A)
5. Çinko asetat (ZnAc) (Sigma, Ürün No:Z0625)
6. Trikloroasetik asit (TCA) (Sigma, Ürün No:T9159)
7. Propargilglisin (PAG) (Santa Cruz, Ürün No:sc-294408)
8. Pridoksal-5'-fosfat (PP) (Sigma, Ürün No:P3657)
9. L-sistein (Sigma, Ürün No:C1276)
10. Sodyum hidrosülfit hidrat (NaHS) (Sigma Aldrich, Ürün No:161527)
11. SMART BCA Protein Assay (Intron Bio, Ürün No:21071)
12. Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Santa Cruz, Ürün No:sc-29130)
13. Phosphatase Inhibitor Cocktail (Santa Cruz, Ürün No:sc-45065)

14. İnsulin Elisa Kit (Merck Milipore, Ürün No:EZRMI-13K)

15. Üretan (Aldrich, Ürün No:U2857)

16. Alfa-kloraloz (Sigma, Ürün No:C0128)

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



Şekil 10. Araştırma Planı ve Takvimi

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler ortalama±SEM olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel yöntem olarak ikili grup karşılaştırılmasında student t-testi kullanılmıştır. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmanın başlangıcında sıçanların kuyruk veninden alınan kanlar hemolizli olduğundan ve kalan plazma ile serum miktarı ölçüm için yeterli olmadığından başlangıç biyokimyasal parametreleri değerlendirmeye alınamamıştır. Bu nedenle kontrol ve metS gruplarının sadece bitiş parametreleri karşılaştırılmıştır. Bu durum çalışmamızın sınırlılıklarından biridir.

In vitro organ banyosu deneylerinde, H_2S 'ün vasküler etkilerini değerlendirmeyi amaçlayarak sağlıklı ve metS oluşturan sıçan aortlarında L-sistein bağımlı gevşeme yanıtlarını değerlendirdik. Bulgularımızda L-sistein aracılı gevşeme yanıtlarında bir farklılık görülmemiştir. Ancak net sonucun ortaya konması için bu bulgumuzun aorta H_2S düzey ölçümü ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu da çalışmamızın sınırlılıklarından biridir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığınca değerlendirilerek 57/2014 no'lu kararı ile onaylanmıştır.

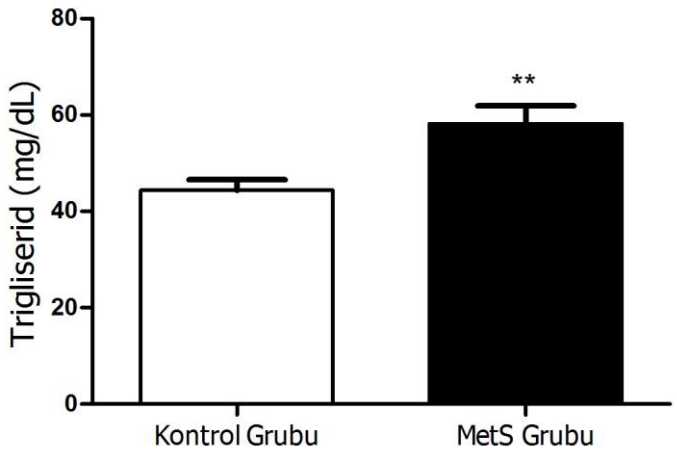
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametlerin Değerlendirilmesi

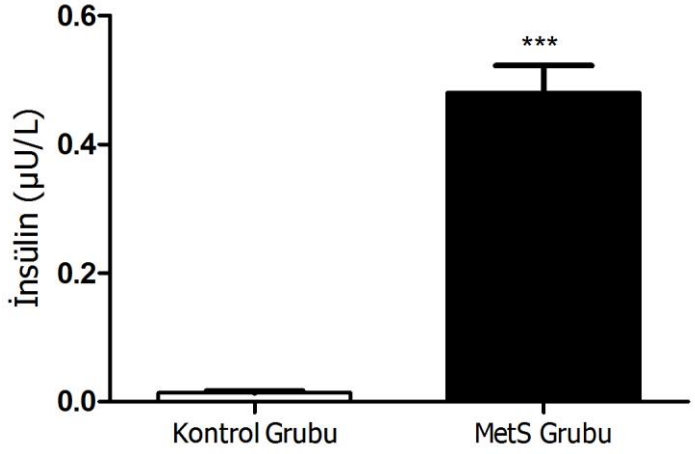
On hafta boyunca standart diyet ile beslenen kontrol grubu ve %60 fruktoz içeren diyet ile beslenen metS grubunun plazma trigliserid, ürik asit ve kan glukoz insülin değerleri ölçülmüştür. Kontrol ve metS grubunda metabolik değişiklikleri değerlendirmek amacıyla başlangıç ve bitiş kanları alınmıştır.

Çalışmanın başlangıcında kuyruk veninden alınan başlangıç kanları hemolizli olduğundan ve alınan kandan kalan plazma miktarı ölçüm için yeterli olmadığından dolayı başlangıç parametreleri değerlendirilememiştir.

MetS grubunda bitiş trigliserid ve insülin değerleri ortalamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla, p=0,0029; p<0,0001) (Şekil 11,12) (Tablo 5).

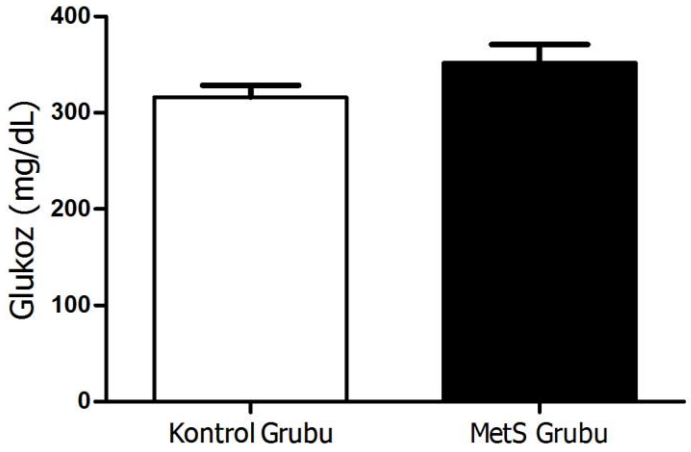


Şekil 11. Kontrol ve metS gruplarında trigliserid değerleri karşılaştırılması

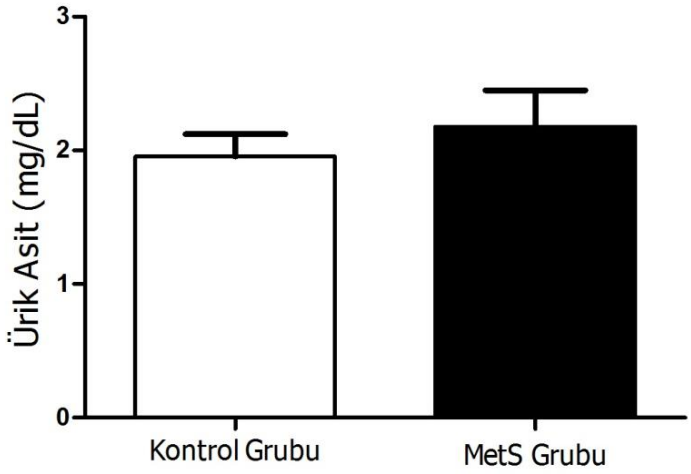


Şekil 12. Kontrol ve metS gruplarında insülin değerleri karşılaştırılması

Glukoz ve ürik asit değerleri ortalamalarına bakıldığında metS grubunda kontrol grubuna göre artış görülmüştür, ancak bu artış anlamlı değildir (sırasıyla, p=0,1259; p=0,5127) (Şekil 13,14) (Tablo 5).

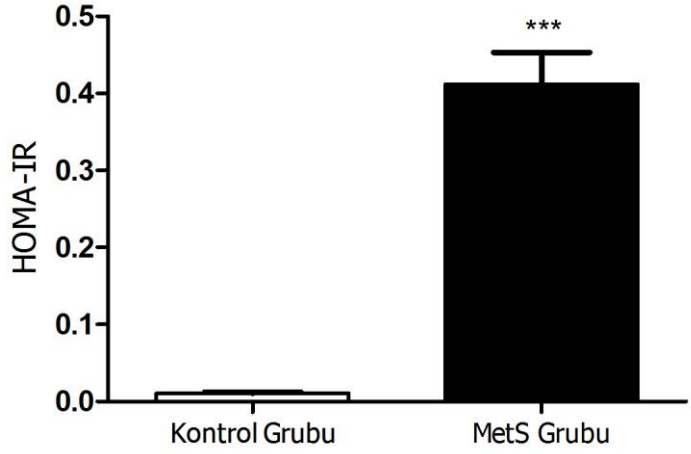


Şekil 13. Kontrol ve metS gruplarında glukoz değerleri karşılaştırılması



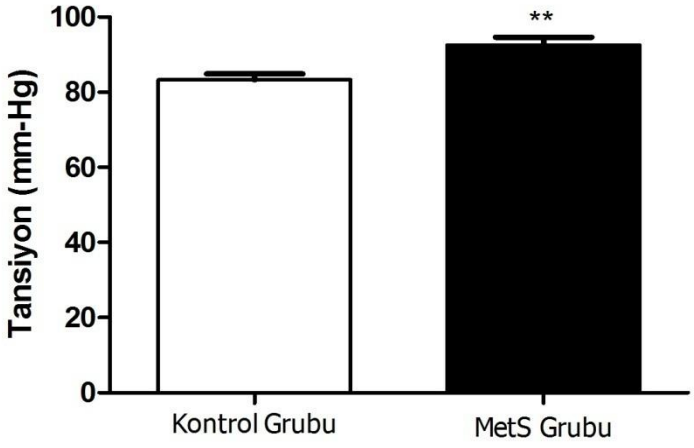
Şekil 14. Kontrol ve metS gruplarında ürik asit değerleri karşılaştırılması

İnsülin rezistansı oluşup oluşmadığını belirlemek için HOMA-IR formulasyonu kullanılmıştır. HOMA-IR hesaplamasına göre, metS grubu ortalaması anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$) (Şekil 15) (Tablo 5).



Şekil 15. Kontrol ve metS gruplarında HOMA-IR karşılaştırılması

Aynı zamanda metS grubunda hipertansiyon oluşumunu belirlemek için in vivo kan basıncı ölçümü aracılığıyla kontrol ve metS grubu ortalama tansiyon değerleri karşılaştırılmıştır. MetS grubu OAB ortalaması kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,0011$) (Şekil 16) (Tablo 5).



Şekil 16. Kontrol ve metS gruplarında tansiyon ortalamaları karşılaştırılması

Tablo 5. Plazma glukoz, trigliserid, ürik asit, insülin değerleri, HOMA-IR hesaplaması ve tansiyon ortalamaları (Bağımsız gruplarda t test, $p<0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi)

	Kontrol Grubu (n=21)	**MetS Grubu (n=21)**	**p değeri**
Glukoz (mg/dL)	316,1±12,47	351,7±19,03	0,1259
Trigliserid (mg/dL)	44,38±2,18	58,14±3,76	0,0029**
Ürik Asit (mg/dL)	1,95±0,17	2,18±0,27	0,5127
İnsülin (µU/L)	0,01±0,003	0,48±0,04	<0,0001***
HOMA-IR	0,01±0,001	0,41±0,04	<0,0001***
Tansiyon (mm-Hg)	83,29±1,62	92,52±2,06	0,0011**

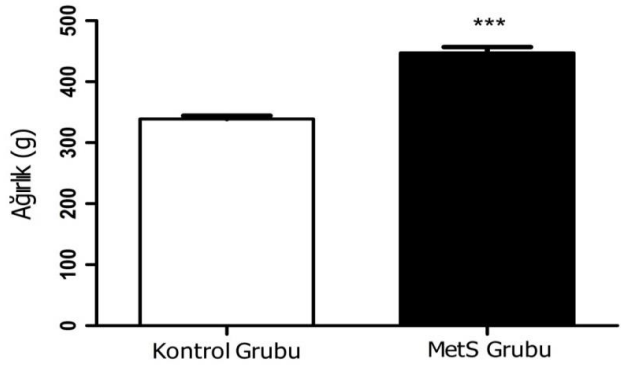
4.2. Vücut Ağırlığı ve Bel Çevresi Ölçümlerinin Karşılaştırılması

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları ve bel çevresi/tibia oranları her iki grupta da çalışma başlangıcı ve 10. hafta sonunda değerlendirilmiştir (Tablo 6).

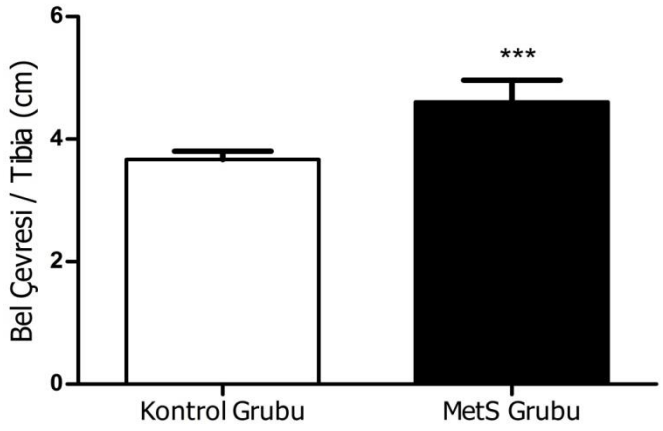
Tablo 6. Deney hayvanlarının deney başlangıcı ve 10. hafta sonundaki ağırlıkları (Bağımlı gruplarda t test, p<0,05 değerleri anlamlı kabul edildi).

	Kontrol Grubu (n=21)		**MetS Grubu (n=21)**	
	1. Hafta	**10. Hafta**	**1. Hafta**	**10. Hafta**
Vücut Ağırlığı (g)	202,7±2,46	339±5,48	205,8±2,04	447,2±9,68
Bel Çevresi/tibia (cm)	3,7±0,04	3,7±0,03	3,7±0,03	4,6±0,08

Çalışma süresi boyunca her iki gruptaki hayvanlarda kilo alımı olmuş, başlangıç ve bitiş ağırlık ortalamaları gruplar içinde karşılaştırıldığında her iki grupta da anlamlı bir artış saptanmıştır. İki grubun 10. hafta değerleri karşılaştırıldığında, metS grubu bitiş ağırlık ortalaması, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (p<0,0001). Bel çevresi/tibia uzunluğu ortalamaları başlangıç ve bitiş değerleri, kontrol grubunda değişmezken, metS grubunda artış göstermiştir. İki grubun 10. hafta değerleri karşılaştırıldığında ise, metS grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (p<0,0001) (Şekil 17,18).



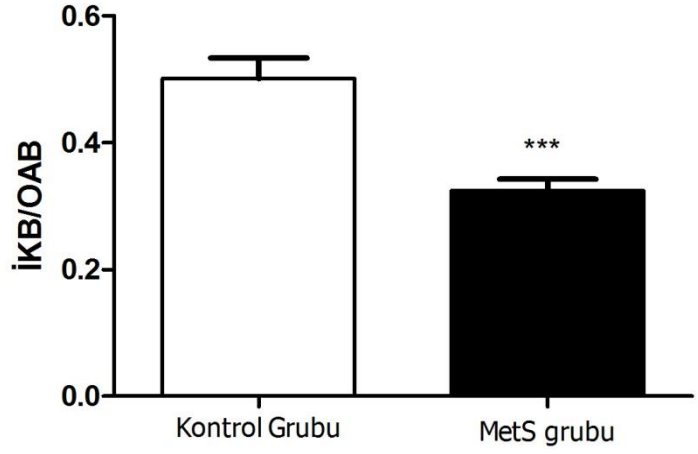
Şekil 17. Kontrol ve metS grubu ağırlık ortalamaları karşılaştırılması



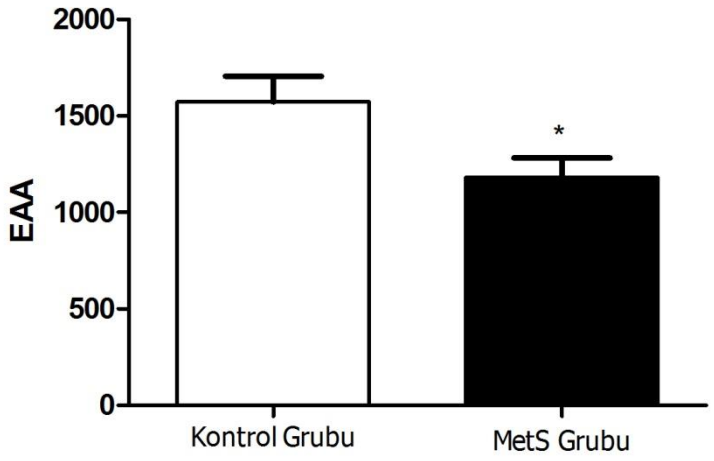
Şekil 18. Kontrol ve metS grubu bel çevresi/tibia uzunluğu ortalamları karşılaştırılması

4.3. İn vivo intrakavernöz basınç değerlendirilmesi ve H_2S'ün Etkisi

MetS grubunda ED gelişimini belirlemek için kontrol grubu ve metS grubunun SF veya NaHS enjeksiyonu yapılmadan hemen önceki İKB/OAB ve EAA ortalamaları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak metS grubu bazal İKB/OAB ve EAA ortalamasının kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu gösterilmiştir (sırasıyla, $p<0,0001$, $p=0,0274$). Bu durumda metS grubunda ED gelişimi gözlenmiştir (Şekil 19,20) (Tablo 7).



Şekil 19. Kontrol ve metS grubu İKB/OAB ortalamaları karşılaştırılması



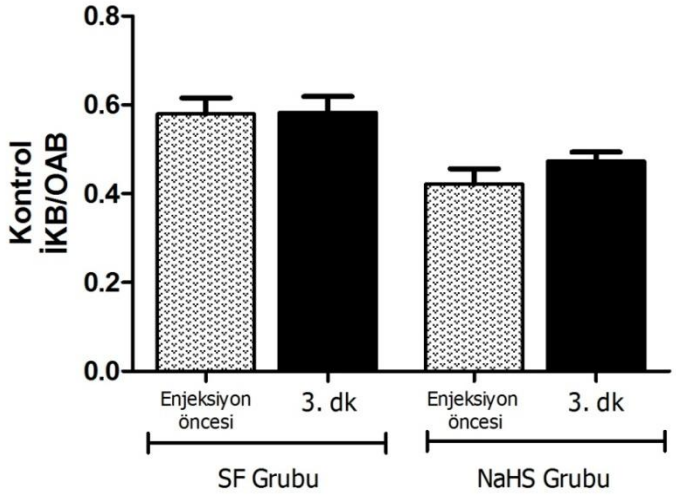
Şekil 20. Kontrol ve metS grubu EAA ortalamaları karşılaştırılması

Tablo 7. Kontrol ve metS grubu İKB/OAB ve EAA ortalamaları (Bağımsız gruplarda t test, p<0,05 değerleri anlamlı kabul edildi)

	Kontrol Grubu (n=14)	**MetS Grubu (n=14)**
İKB/OAB	0,50±0,03	0,32±0,02
EAA	1573±133,4	1181±102

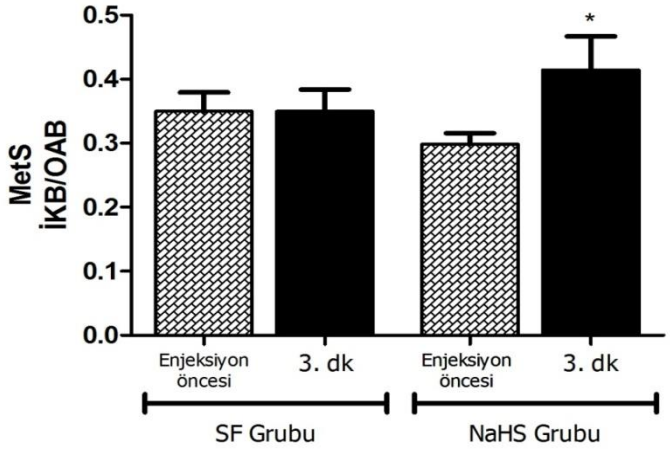
MetS ve kontrol gruplarında SF ve NaHS enjeksiyonunun erektil yanıtlara etkisini değerlendirdiğimizde;

Kontrol grubunda, SF enjeksiyonu yapılmadan önce ölçülen İKB/OAB oranı ve EAA değerleri ile 3. dakikada alınan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (İKB/OAB p=0,9361, EAA p=0,4991). Benzer olarak NaHS enjeksiyonu yapılmadan önce ölçülen İKB/OAB oranı ve EAA değerleri ile NaHS uygulaması yapıldıktan sonra 3. dakikadaki İKB/OAB oranı ve EAA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla, p=0,0772, p=0,3099) (Şekil 21) (Tablo 8).



Şekil 21. Kontrol grubu SF ve NaHS enjeksiyonu öncesi ve sonrası İKB/OAB ortalamaları karşılaştırılması

MetS grubunda, SF enjeksiyonu öncesi ve sonrası 3. dakikadaki İKB/OAB oranı ve EAA arasında anlamlı bir fark yoktur (sırasıyla, p=1,000, p=0,2617). SF grubundan farklı olarak NaHS enjeksiyonu öncesi ve sonrası 3. dakikadaki İKB/OAB oranı ve EAA değerleri karşılaştırıldığında 3. dakikadaki İKB/OAB oranı, NaHS uygulamasından önceki İKB/OAB oranınına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (p=0,0436). Ancak EAA ortalamaları arasında anlamlı bir fark yoktur (p=0,3134) (Şekil 22) (Tablo 8).



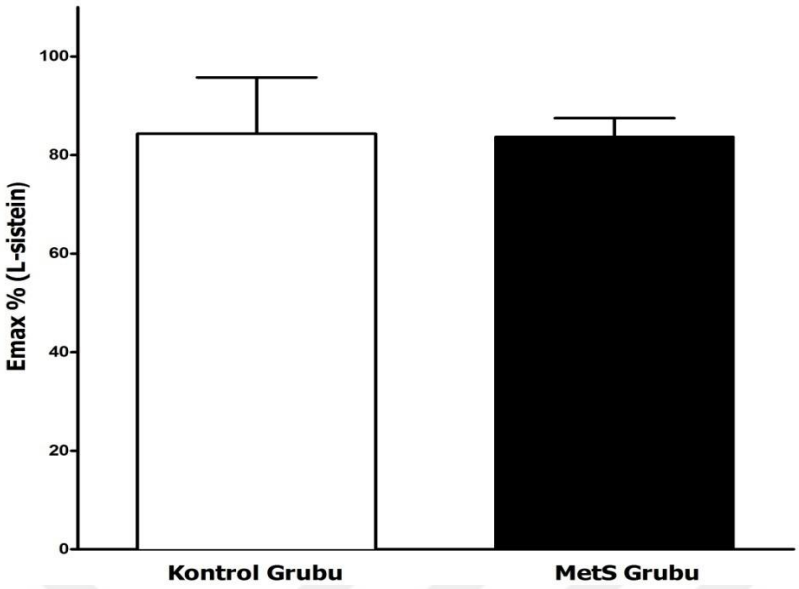
Şekil 22. MetS grubu SF ve NaHS enjeksiyonu öncesi ve sonrası İKB/OAB ortalamaları karşılaştırılması

Tablo 8. Kontrol ve metS grubu SF ve NaHS enjeksiyonu öncesi ve sonrası (3.dakikadaki) İKB/OAB ve EAA ortalamaları (Bağımsız gruplarda t test, p<0,05 değerleri anlamlı kabul edildi)

Gruplar		**İKB/OAB**	**3. Dakika İKB/OAB**	**EAA**	**3. Dakika EAA**
Kontrol Grubu	**SF (n=7)**	0,58±0,04	0,58±0,04	1831±182	1911±179
	NaHS (n=7)	0,42±0,03	0,47±0,02	1315± 148	1489±130
MetS Grubu	**SF (n=7)**	0,35±0,03	0,35±0,03	1258±168	1192±141
	NaHS (n=7)	0,30±0,02	0,41±0,05	1103±122	1272±162

4.4. İn vitro organ banyosunda gevşeme yanıtları üzerine H_2S'ün etkisi

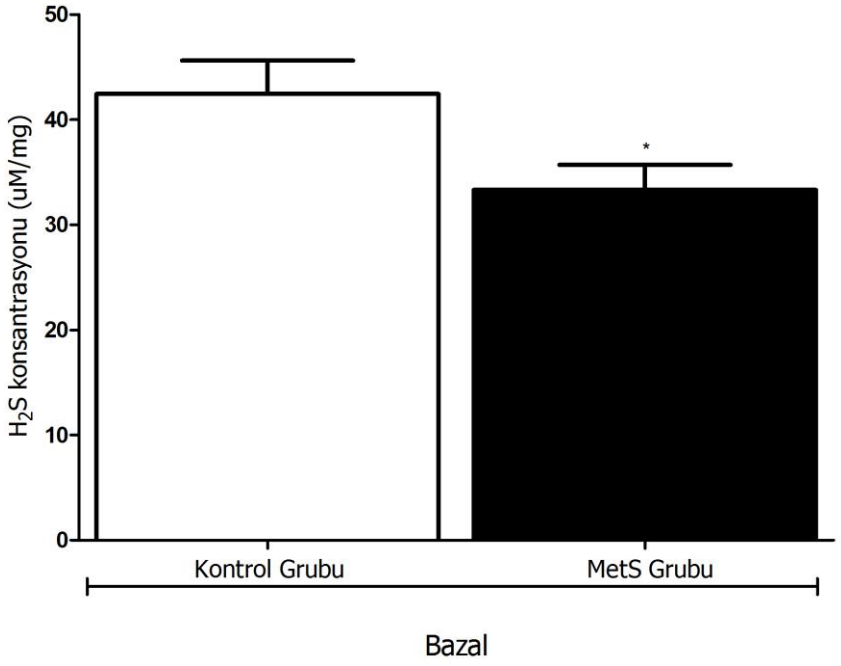
Aorta dokusunda H_2S bağımlı gevşeme yanıtları değerlendirilerek penil dokudaki H_2S yolağının vasküler yapı ile korelasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla organ banyosu sisteminde H_2S'ün metabolik prekürsorü olan L-sistein aracılı gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. In vitro deneylerde, metS grubunda aortada L-sistein aracılı oluşan maksimal gevşeme (Emax) yanıtlarında bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 23).



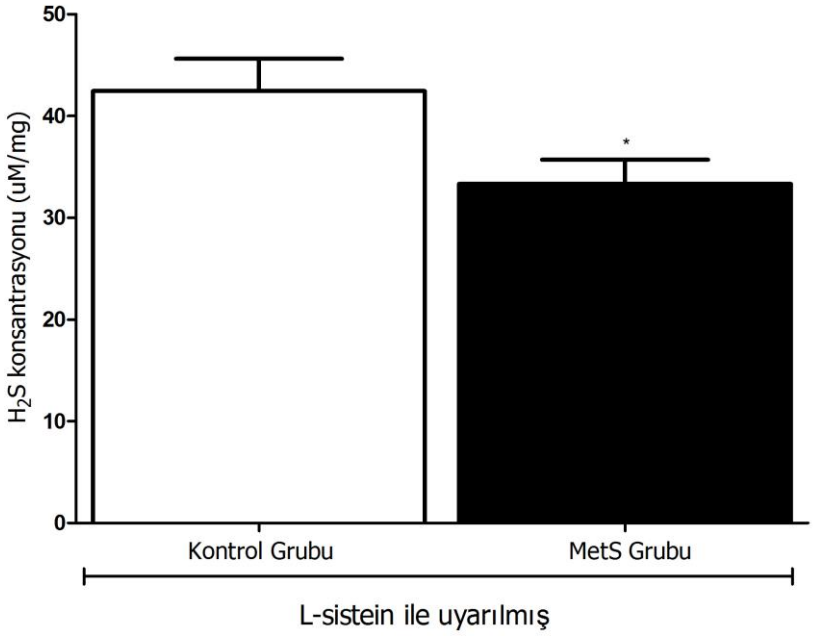
Şekil 23. Kontrol ve metS grubunda fenilefrin ile kastırılan dokuların L-sistein aracılı maksimal gevşeme yanıtları

4.5. Penil dokudaki H_2S düzeylerinin değerlendirilmesi

MetS patofizyolojisinde penil dokudaki H_2S düzeyleri değişimini değerlendirmek amacıyla metilen mavisi deneyi yapılmıştır. MetS grubunda penil dokudaki H_2S düzeyleri kontrol grubuna göre azalmıştır. Bazal değerler göz önünde bulundurulduğunda bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ($p=0,0819$), L-sistein ile uyarılmış örneklerde MetS grubundaki H_2S düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir ($p=0,0003$) (Şekil 24,25).



Şekil 24. Kontrol ve metS gruplarında bazal homojenatlarda H_2S düzeyleri karşılaştırılması



Şekil 25. Kontrol ve metS gruplarında L-sistein ile uyarılmış homojenatlarda H_2S düzeyleri karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

21. yy'da temel yaşam tarzı bozukluklarından biri olarak kabul edilen metS insidansı gün geçtikçe artmaktadır. MetS gelişimine yol açan faktörlerin başında yüksek karbonhidrat ve yüksek yağlı diyet ile beslenmenin yanı sıra sedanter yaşam tarzı gelmektedir. MetS'nin ilk bulgularından biri olarak kabul edilen ED'un ise metS gelişimi ile yakından ilgili olduğu konu alanında hızla artan çalışmalar aracılığıyla gösterilmiştir [24, 87]. Ancak halen metS-ED mekanizmasını araştıran detaylı çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmamızda amaçlanan, yüksek fruktozlu diyet aracılı metS oluşumunu, metS'a bağlı ED gelişimini, bu patogenez üzerinde H_2S'ün etkisini ve metS'da penil dokudaki H_2S konsantrasyonlarını değerlendirerek, metS'a bağlı ED'da H2S'ün erektil fonksiyonlar üzerine olası etkisini ve patofizyolojik koşullar altında dokudaki düzeyini ortaya koymaktır. Bu amaçla yüksek fruktozlu diyet aracılığıyla (%60 oranında) metS modeli oluşturulan Wistar sıçanların 10. hafta sonunda vücut ağırlıkları, biyokimyasal parametreleri, in vivo ortamda intrakavernöz NaHS/SF uygulaması ile İKB/OAB oranı, in vitro ortamda aortada L-sistein aracılı gevşeme yanıtları ve metilen mavisi yöntemiyle penil dokudaki H_2S düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışma bulgularına göre metS grubunda trigliserid ve insülin değerleri, HOMA indeksi, vücut ağırlığı, bel çevresi/tibia oranı ve kan basıncı ortalaması kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. MetS grubunda İKB/OAB ve EAA oranı anlamlı olarak düşük olduğu gösterilerek ED oluşumu bildirilmiştir. İntrakavernöz NaHS uygulaması ise yine metS grubunda İKB/OAB oranında anlamlı bir artışa yol açmıştır. Fakat kontrol grubundaki NaHS uygulaması sonucu görülen artış anlamlı değildir. In vitro organ banyosu çalışmasında ise metS grubunda aortada L-sistein aracılı gevşeme yanıtlarında bir değişiklik yoktur. Penil dokudaki H_2S düzeylerinin ise metS grubunda azaldığı gösterilmiştir.

MetS, abdominal obezite, yüksek kan basıncı, hiperglisemi, dislipidemi, insülin rezistansı ve glukoz intoleransı gibi metabolik anomali topluluğundan oluşan ve birçok klinik durumda tip 2 diabet ve vasküler patolojilerle ile ilişkilendirilen progresif bir hastalıktır 48-49. DSÖ'nün tanımladığı metS tanı kriterlerine göre, kişide insülin rezistansı varlığında; artmış yüksek bel çevresi oranı, trigliserid değerlerinin yüksek

veya HDL kolesterol konsantrasyonun düşük olması, kan basıncı artışı gibi faktörlerin en az ikisini karşılıyorsa metS tanısı koyulabilir [76].

Son yıllarda deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar ve klinik çalışmaların verileri doğrultusunda yüksek yağ ve şeker tüketimine bağlı olarak uzun vadede diabet gelişimi ve ilgili metabolik ve kardiyovasküler hastalıkların görülme oranı artmaktadır. Tip 2 diabet gelişimi riskini arttıran en önemli faktörlerden biri fruktoz içeren besin tüketimidir. Bu nedenle, metS ve tip 2 diabet hayvan modellerinde insandaki patofizyolojiyi en iyi temsil eden modellerden biri olarak öngörülen yüksek fruktozlu diyet temel ve vazgeçilmez unsur olarak düşünülmektedir [80].

Deneysel modellerde yüksek yağ ile yüksek fruktoz tüketimine bağlı ve genetik temelli modeller üzerinde metS gelişimi gösterilmiştir. Metabolik hastalıklar üzerinde yapılan çalışmalarda modeli daha iyi temsil ettiği ve daha doğru sonuçlar ortaya koyduğu için genellikle Wistar türü sıçanlar tercih edilmektedir. Ancak deney hayvanları için, insanlarda tanımlanan metS tanı kriterleri gibi belirgin ve standart tanı kriterleri henüz ortaya konmamıştır. Yüksek fruktozlu diyet ile beslenen deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda glukoz intoleransı, insülin rezistansı, hiperinsülinemi ve dislipidemi oluşumu gösterilmiştir. Bu metabolik bozukluklar, genel olarak hem insan hem de hayvan modellerinde yüksek fruktozlu besleme ile gözlenen insülin rezistansı oluşumunu tetiklemektedir. Yüksek fruktoz diyeti ile metS modeli oluşturulan deney hayvanlarında fruktoz oranı, beslenme süresi ve bunlara bağlı olarak meydana gelen metabolik değişiklikler, çalışmalar arasında deney dizaynına göre oldukça farklılık göstermektedir. Aynı zamanda kontrol diyetindeki doğal varyasyonlar da deney hayvanı çalışmalarında bir başka potansiyel sorundur. Çalışmalarda fruktoz uygulamasında kullanılan farklı deney dizaynları fizyolojik yanıtlarda değişkenliklere yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda, genellikle 8-12 hafta arası içme suyuna fruktoz ilave edilerek (%10, %20, %25 oranında) veya yüksek oranda fruktoz içeren (%60-65 oranında) özel diyetler kullanılarak deney hayvanları üzerinde metS modeli oluşturulmuştur [80, 86].

Farklı deney protokolleri oluşturarak, farklı oranlarda ve sürelerde yüksek fruktoz tüketimi ile Wistar sıçanların metabolik parametlerini analiz eden bir çalışmada üç farklı deney protokolüne göre, içme suyuna %10 fruktoz ilave edilen ve standart diyetle 8 hafta beslenen birinci grup; %60 fruktozlu diyetle 4 hafta beslenen ikinci grup ve %60 fruktozlu diyetle 8 hafta beslenen üçüncü grup olarak dizayn edilmiştir. Sonuçta %60 fruktozla 8 hafta boyunca beslenen üçüncü grupta diğer gruplara göre daha etkili bir şekilde metS belirtilerine sahip olduğu gösterilmiştir [86]. Bir başka çalışmada ise düzenli olarak farklı oranlarda yüksek fruktoz ve yüksek yağ tüketiminin tip 2 diabet ve metS gelişimi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla model oluşturulacak sıçanlar kontrol, yüksek fruktozlu (HF) (içme suyunda %25 oranında fruktoz), yüksek yağlı (HFD) ve hem yüksek fruktoz hem de yüksek yağlı diyetle (HFHF) 8 ay boyunca beslenmek üzere dört gruba ayrılmıştır. Bu çalışmada ise fruktoz ve yağ kombinasyonu uzun süreli tüketiminin metabolik bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir [80].

Padiya ve ark.'larının yaptığı başka bir çalışmada 8 hafta boyunca %65 oranında fruktoz içeren diyet ile metS modeli oluşturulmuştur. Bu çalışmanın bulgularına göre kontrol ve metS grubunun vücut ağırlıkları arasında bir fark görülmezken glukoz ve ürik asit değerleri metS grubunda diğer gruplara oranla anlamlı olarak bir artış göstermiştir. Serum trigliserid ve insülin değerleri de benzer olarak yüksek bulunmuştur. Glukoz tolerans testinin sonuçlarına göre ise metS grubunda insülin rezistansı oluşumu bildirilmiştir. Sonuçta yüksek fruktoz kaynaklı diyetin insülin rezistansı ve metabolik bozukluk kaynaklı metS gelişimine neden olduğu gösterilmiştir [88].

Bu bilgilerden yola çıkarak bizim çalışmamızda da insana en yakın modeli temsil eden yüksek fruktoz alımına bağlı olarak metS modeli oluşturulmuştur. Değerlendirilen metabolik parametrelerde insanda belirlenen tanı kriterlerine en yakın parametreler baz alınmıştır. Wistar sıçanların 10 hafta %60 fruktoz diyetiyle beslenme sonunda vücut ağırlığı, bel çevresi/tibia oranı, glukoz, ürik asit, trigliserid, ürik asit, insülin değerleri, HOMA-IR ve ortalama kan basıncı sonuçları değerlendirilmiştir. Bulgularımıza göre Padiya R ve ark.'larının çalışmalarına benzer

olarak serum trigliserid ve insülin değerleri yüksek bulunmuştur. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda glukoz düzeylerinde metS grubunda bir artış görülmekle beraber, bu artışın anlamlı olmadığı saptanmıştır. Bu sonuca göre, kontrol grubundaki hayvanların glukoz düzeylerinin yaşa bağımlı olarak arttığı düşünülmüştür. Yine ürik asid düzeyinde de Padiya R ve arkadaşlarından farklı olarak anlamlı bir artış saptanmamıştır. Sonuç olarak çalışmamızda metS grubunda insülin rezistansı, serum trigliserid artışı ayrıca tanı kriterlerinde bulunan obezite ve ortalama kan basıncı artışı ile metS modeli oluşturulmuştur.

MetS-ED arasındaki ilişki daha çok klinik ve epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konmuştur. MetS hastalarında ED prevalansının iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. MetS risk faktörlerinin çoğu ED görülme riskini arttırmaktadır [24]. Yapılan deneysel çalışmalarda ise genellikle yüksek yağ diyeti kaynaklı metS modeli ve streptozotosin-kaynaklı diabet hayvan modelleri kullanılarak erektil yanıtlar değerlendirilmiştir [15]. Bizim çalışmamız yüksek fruktoz diyeti aracılı oluşturulan metS modelinde, metS-ED ilişkisini araştıran ve bu patoloji üzerinde in vivo kavernöz basınç ölçümü ile H_2S'ün etkisini değerlendiren ilk çalışmadır.

MetS-ED ilişkisini araştıran çalışmalarında Kim SD ve ark.'ları 12 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenmiş sıçanlarda metS modeli oluşturmuşlardır. Bu çalışmada MetS grubunda değerlendirilen vücut ağırlığı, sistolik kan basıncı, insülin değerleri ve HOMA-IR parametrelerinin anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmektedir. İn vivo erektil yanıtlara bakıldığında İKB/OAB oranının metS grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirtilerek ED gelişimi gözlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca İKB değerleri karşılaştırılmış ve metS'da değişiklik olmadığı bildirilmiştir [24]. Bizim çalışmamızda ise 10 hafta boyunca yüksek fruktoz diyeti ile beslenen hayvanlarda, kontrol grubuna göre İKB/OAB oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda Kim SD ve ark.'larının çalışmasından farklı olarak ayrıca total İKB'ın göstergesi olan EAA değerlerinde de azalma saptanmıştır. Bulgularımıza göre metS'a bağlı erektil fonksiyonlarda bozulma saptanmıştır.

H_2S'ün sitoprotektif bir endojen modülatör olarak birçok fizyolojik fonksiyonu tanımlanmıştır. H_2S üretimini sağlayan enzimlerin kardiyovasküler, nöronal, immün, renal, solunum, gastrointestinal, ürogenital ve endokrin sistemlerde eksprese edilmesinin keşfinin ardından, H_2S'ün bu sistemler üzerinde önemli fizyolojik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, H_2S'ün hipertansiyon, ateroskleroz, kalp yetmezliği, diabet, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, ED, metS ve astım gibi patolojik rahatsızlıklarda rol oynadığı ve yeni bir terapötik hedef olabileceği düşünülen H_2S'ün patofizyolojik durumlardaki rolü ve etkisi hala tartışma konusudur ve çalışmalar halen devam etmektedir [34].

Kardiyovasküler sistemde H_2S'ün koruyucu rolü ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında H_2S eksikliğinde hipertansiyon gelişimi gözlendiği ve H_2S'ün kardiyovasküler hastalıklar üzerinde yararlı bir tedavi hedefi olabileceği öne sürülmüştür [89, 90].

MetS'da H_2S'ün rolünü irdeleyen çalışmalarda ise insülin sekresyonunda anahtar rol oynadığı bilinmesine rağmen insülin rezistansı üzerindeki rolü hala tartışma konusudur. Zucker diabetik fatty (ZDF) sıçanlarda yapılan bir çalışmada H_2S sentezinden sorumlu enzim olan CSE ekpresyonunun anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. Ayrıca serum insülin değerlerinin, hiperglisemi ve insülin rezistansının azaldığı bildirilerek insülin rezistansında H_2S'ün kompanzatuvar olarak arttığı ortaya konmuştur . Aynı çalışmada, pankreatik H_2S üretimi inhibe edildiğinde, serum insülin değerlerinin arttığı ve hipergliseminin azaldığı bildirilmektedir. Bu sonuçlar, pankreatik H_2S üretimin inhibisyonunun, insülin sekresyonunun artması ile diabet gelişiminde yeni bir terapötik olarak kullanılabileceğini öne sürmektedir [91].

Çalışmamızda ilk kez H_2S'ün metS-bağımlı ED'nda intrakavernozal basınç üzerindeki etkisi araştırılmıştır. H_2S'ün erektil fonksiyonlar üzerine etkisini inceleyen in vivo koşullar altında, sağlıklı sıçanlarda yapılan çalışmada, H_2S'ün penil ereksiyonda doğal bir mediyatör olarak görev aldığı öne sürülmüştür. 2009 yılında d'Emmanuele ve ark.'ları tarafından yapılan bu çalışmada aynı zamanda, insan penil dokusunda CSE ve CBS enzimlerinin eksprese edildiği ve H_2S üretiminin gerçekleştiğinin yanı sıra; in

vitro olarak NaHS ve L-sistein'in gevşeme yanıtına aracılık ettiği gösterilmiştir. Sıçanlar üzerinde ise intrakavernöz NaHS ve L-sistein uygulaması yapılmış ve kavernöz sinir stimülasyonu sırasındaki toplam İKB değerinde (EAA) doza bağımlı olarak anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte L-sistein cevapları PAG tarafından inhibe edilmiştir [10]. Bizim çalışmamızda ise kontrol grubu hayvanlarımızda intrakavernöz NaHS uygulamasına bağlı İKB/OAB oranında bir artış görülmüştür ancak bu artış anlamlı değildir. Ancak patolojik koşullar altında yani metS grubunda NaHS'in İKB/OAB oranında anlamlı bir artışa neden olduğu ve erektil yanıtları düzelttiği gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre sağlıklı hayvanlarda eksojen H_2S'ün erektil yanıtlara sağladığı katkı patolojik koşullar oluştuğunda belirginleşmektedir. Bu da bize H_2S'deki azalmanın metS'a bağlı ED'dan sorumlu olabileceğini düşündürmüştür.

MetS, vasküler hastalıklarda rol oynayan endotelyal disfonksiyona ve sonuçta da ED ile sonuçlanan bozukluklara sebep olmaktadır. Buradan yola çıkarak H_2S'ün erektil ve vasküler yanıtlar üzerindeki etkilerinin korelasyonunu saptamak amacıyla oluşturduğumuz metS modelinde endotel bağımlı gevşemeye aracılık ettiği öne sürülen H_2S 'ün vasküler etkilerini değerlendirmeyi amaçladık. Bu amaçla sağlıklı ve metS oluşturan sıçan torakal aortlarında L-sistein bağımlı gevşeme yanıtlarını değerlendirdik. Bulgularımızda L-sistein aracılı gevşeme yanıtlarında bir farklılık saptamadık. Ancak net sonucun ortaya konması için bu bulgumuzun aorta H_2S düzey ölçümü ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu da çalışmamızın kısıtlılıklarından biridir.

Çeşitli dokularda H_2S düzeylerinin patolojik koşullar altında hem azaldığını hem de arttığını dolayısıyla etkilenen organa bağlı olarak H_2S regülasyonunun değişebileceğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genel olarak tip 1 diabette H_2S düzeyleri araştırılmıştır. Brancaleone V ve ark.'larının yaptığı çalışmada diabet olan ancak obez olmayan farelerde hastalık şiddetine paralel olarak plazma ve aortadaki endojen H_2S üretiminin azaldığı gösterilmiştir [69]. Benzer şekilde tip 1 modeli oluşturulmuş farelerde H_2S biyosentezinin azaldığı bildirilmiştir [92]. Tam tersi sonuçlara sahip bir başka çalışmada ise diabet patolojisi ile ilişkisi

tanımlanan H_2S'ün streptozotosin-kaynaklı diabet sıçan modelinde plazma H_2S düzeyleri değişmezken, pankreas ve karaciğerde üretimin arttığı gösterilmiştir [93].

Yüksek fruktoz diyeti ile metS modeli oluşturulan deney hayvanlarında serum H_2S düzeyleri değerlendirileren bir çalışmada ise, metS grubunun H_2S düzeylerinde anlamlı düşüş gösterilmiştir [88]. Patolojik koşullarda H_2S'ün penil dokudaki değişimini araştıran çalışmalara baktığımızda, streptozotosin-kaynaklı diabetik ED modelinde ve in vitro hücre kültüründe yapıldığı gözlenmektedir. Zhang Y ve ark.larının 2016 yılında yaptıkları çalışmada, streptozotosin-kaynaklı diabete bağlı oluşan ED'lu sıçanların penil dokusunda metilen mavisi yöntemiyle endojen H_2S üretimin azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda in vitro hücre kültüründe de hiperglisemik koşullar altında, korpus kavernozum düz kas hücrelerinde H_2S üretiminin azaldığı gösterilmiştir [94]. Yine streptozotosin-kaynaklı diabet modeli oluşturulmuş sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, diabetik sıçanların penil korpus kavernozum dokularında CBS ve CSE ekspresyonlarının azalması ve H_2S konsantrasyon düzeylerinin düşmesi, hiperglisemi kaynaklı ED üzerinde H_2S sinyal yolağının rol oynayabileceği düşünülmüştür [70]. Bu çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda literatürde ilk olarak metS koşulunda penil dokudaki H_2S düzeylerini araştırdık. Çalışma sonuçlarımıza göre metS'lu hayvanların penil dokularında hem bazal hem de L-sistein varlığında H_2S düzeyleri azalma göstermiştir. Bu bulgumuz H_2S'deki azalmanın metS'a bağlı ED'dan sorumlu olabileceğini görüşümüzü destekler yöndedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdaki yüksek fruktoz diyetine bağlı metS modeli oluşumu ve H_2S'ün metS-bağımlı ED'ndaki etkisine dair temel bulgularımız aşağıdaki şekildedir:

1. %60 oranında fruktoz diyeti ile beslenen deney hayvanlarında metS gelişimi gösterilmiştir.
2. MetS grubu sıçanlarda ED oluşumu in vivo kavernöz basınç ölçümü aracılığıyla bildirilmiştir.
3. H_2S'ün metS-bağımlı ED'da erektil yanıtları düzelttiği gösterilmiştir.
4. Aortada L-sistein aracılı gevşeme yanıtlarının metS grubunda değişmediği gösterilmiştir.
5. MetS grubunda penil dokudaki H_2S düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Deney hayvanlarında metS modeli oluşumu üzerine yapılan çalışmalar içerik, zaman ve kullanılan hayvan türüne göre farklılıklar göstermektedir [86]. Biz çalışmamızda son yıllarda tüm dünyada fruktoz tüketiminin artmasından ve fruktoz tüketiminin metS gelişiminde temel rol oynadığı bilindiğinden dolayı, insana en yakın modeli temsil eden yüksek fruktozlu diyet aracılı metS modeli oluşturduk. Yaptığımız analizler sonucunda da kontrol grubuna göre patolojik grupta metS gelişiminin oluştuğu gösterilmiştir.

Çalışmamız yüksek fruktozlu metS-aracılı ED oluşumunu gösteren ilk çalışma olmasının yanı sıra bu patoloji üzerinde H_2S'ün in vivo etkisini de değerlendiren ilk çalışmadır. Yapılan çalışmalarda H_2S'ün patolojik durumlarda plazma ve çeşitli dokulardaki konsantrasyonları farklılık göstermektedir. Biz çalışmamızda, metS-aracılı ED patogenezinde penil dokudaki H_2S düzeylerinin azaldığını gösterdik. Benzer şekilde Zhang Y ve ark.larının yaptıkları çalışmada, streptozotosin-kaynaklı diabetik ED'lu sıçanların penil dokusunda da endojen H_2S üretimin azaldığı gösterilmiştir [94]. Bu bulgular doğrultusunda, penil dokudaki H_2S düzeylerinin azalması ile ED gelişimi arasında bir ilişki olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışma sonuçlarının H_2S'ün metS aracılı ED üzerinde alternatif bir tedavi hedefi olabileceğini araştıracak olan gelecek çalışmalara kaynak oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Burnett AL, Chang AG, Crone JK et al. Noncholinergic penile erection in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. J Androl, 2002; 23: 92-7.

2. Cashen DE, MacIntyre DE, Martin WJ. Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase. Br J Pharmacol, 2002; 136: 693-700.

3. Cirino G, Fusco F, Imbimbo C, Mirone V. Pharmacology of erectile dysfunction in man. Pharmacol Ther, 2006; 111: 400-23.

4. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J, 2002; 16: 1792-8.

5. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. EMBO J, 2001; 20: 6008-16.

6. Cheng Y, Ndisang JF, Tang G et al. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004; 287: H2316-23.

7. Schleifenbaum J, Kohn C, Voblova N et al. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. J Hypertens, 2010; 28: 1875-82.

8. Zhao W, Wang R. H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002; 283: H474-80.

9. Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012; 109: 9161-6.

10. d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P et al. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009; 106: 4513-8.

11. Thorve VS, Kshirsagar AD, Vyawahare NS et al. Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management. Journal of diabetes and its complications, 2011; 25: 129-36.

12. Mesquita JF, Ramos TF, Mesquita FP et al. Prevalence of erectile dysfunction in chronic renal disease patients on conservative treatment. Clinics, 2012; 67: 181-3.

13. Vlachopoulos C, Rokkas K, Ioakeimidis N, Stefanadis C. Inflammation, metabolic syndrome, erectile dysfunction, and coronary artery disease: common links. European urology, 2007; 52: 1590-600.

14. Traish AM, Guay A, Feeley R, Saad F. The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction. Journal of andrology, 2009; 30: 10-22.

15. Morelli A, Vignozzi L, Maggi M, Adorini L. Farnesoid X receptor activation improves erectile dysfunction in models of metabolic syndrome and diabetes. Biochimica et biophysica acta, 2011; 1812: 859-66.

16. Corona G, Mannucci E, Petrone L et al. Association of hypogonadism and type II diabetes in men attending an outpatient erectile dysfunction clinic. International journal of impotence research, 2006; 18: 190-7.

17. Corona G, Mannucci E, Schulman C et al. Psychobiologic correlates of the metabolic syndrome and associated sexual dysfunction. European urology, 2006; 50: 595-604; discussion

18. Bal K, Oder M, Sahin AS et al. Prevalence of metabolic syndrome and its association with erectile dysfunction among urologic patients: metabolic backgrounds of erectile dysfunction. Urology, 2007; 69: 356-60.

19. Demir O, Demir T, Kefi A et al. Penile vascular impairment in erectile dysfunction patients with metabolic syndrome: penile Doppler ultrasound findings. Urologia internationalis, 2009; 82: 175-8.

20. Wingard C, Fulton D, Husain S. Altered penile vascular reactivity and erection in the Zucker obese-diabetic rat. The journal of sexual medicine, 2007; 4: 348-62; discussion 62-3.

21. Wingard CJ, Moukdar F, Prasad RY et al. Reversal of voltage-dependent erectile responses in the Zucker obese-diabetic rat by rosuvastatin-altered RhoA/Rho-kinase signaling. The journal of sexual medicine, 2009; 6 Suppl 3: 269-78.

22. Contreras C, Sanchez A, Martinez P et al. Insulin resistance in penile arteries from a rat model of metabolic syndrome. British journal of pharmacology, 2010; 161: 350-64.

23. Sanchez A, Contreras C, Martinez MP et al. Role of neural NO synthase (nNOS) uncoupling in the dysfunctional nitrergic vasorelaxation of penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. PloS one, 2012; 7: e36027.

24. Kim SD, Kim YJ, Huh JS et al. Improvement of erectile function by Korean red ginseng (Panax ginseng) in a male rat model of metabolic syndrome. Asian journal of andrology, 2013; 15: 395-9.

25. Vignozzi L, Morelli A, Filippi S et al. Farnesoid X receptor activation improves erectile function in animal models of metabolic syndrome and diabetes. The journal of sexual medicine, 2011; 8: 57-77.

26. Tomada I, Tomada N, Almeida H, Neves D. Energy restriction and exercise modulate angiopoietins and vascular endothelial growth factor expression in the cavernous tissue of high-fat diet-fed rats. Asian journal of andrology, 2012; 14: 635-42.

27. d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Mirone V, Cirino G. Hydrogen sulfide and erectile function: a novel therapeutic target. Nat Rev Urol, 2011; 8: 286-9.

28. Yetik-Anacak G, Sorrentino R, Linder AE, Murat N. Gas what: NO is not the only answer to sexual function. Br J Pharmacol, 2015; 172: 1434-54.

29. Qiu X, Villalta J, Lin G, Lue TF. Role of hydrogen sulfide in the physiology of penile erection. J Androl, 2012; 33: 529-35.

30. Hurt KJ, Sezen SF, Lagoda GF et al. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012; 109: 16624-9.

31. Lasker GF, Pankey EA, Kadowitz PJ. Modulation of soluble guanylate cyclase for the treatment of erectile dysfunction. Physiology (Bethesda), 2013; 28: 262-9.

32. Liaw RL, Srilatha B, Adaikan PG. Effects of hydrogen sulfide on erectile function and its possible mechanism(s) of action. J Sex Med, 2011; 8: 1853-64.

33. Nagpure BV, Bian JS. Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System. Oxid Med Cell Longev, 2016; 2016: 6904327.

34. Gur S, Kadowitz PJ, Sikka SC et al. Overview of potential molecular targets for hydrogen sulfide: A new strategy for treating erectile dysfunction. Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society, 2015; 50: 65-78.

35. Kruszyna H, Kruszyna R, Smith RP. Cyanide and sulfide interact with nitrogenous compounds to influence the relaxation of various smooth muscles. Proc Soc Exp Biol Med, 1985; 179: 44-9.

36. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci, 1996; 16: 1066-71.

37. 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.

38. di Masi A, Ascenzi P. H2S: a "double face" molecule in health and disease. Biofactors, 2013; 39: 186-96.

39. Beltowski J. Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine--An update. Pharmacol Rep, 2015; 67: 647-58.

40. Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H2S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol Rep, 2007; 59: 4-24.

41. Polhemus DJ, Lefer DJ. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. Circ Res, 2014; 114: 730-7.

42. Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. Nitric Oxide, 2014; 41: 4-10.

43. Yu XH, Cui LB, Wu K et al. Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. Clin Chim Acta, 2014; 437: 78-87.

44. Dunn WR, Alexander SP, Ralevic V, Roberts RE. Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle. Pharmacol Ther, 2016; 158: 101-13.

45. Barr LA, Calvert JW. Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic. Circ J, 2014; 78: 2111-8.

46. Whiteman M, Le Trionnaire S, Chopra M et al. Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. Clin Sci (Lond), 2011; 121: 459-88.

47. Kashfi K, Olson KR. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras. Biochem Pharmacol, 2013; 85: 689-703.

48. Papapetropoulos A, Whiteman M, Cirino G. Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. Br J Pharmacol, 2015; 172: 1633-7.

49. Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H2S): development of H2S-releasing drugs as pharmaceuticals. J Med Chem, 2010; 53: 6275-86.

50. Wu D, Wang J, Li H et al. Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury. Oxid Med Cell Longev, 2015; 2015: 186908.

51. Kohn C, Schleifenbaum J, Szijarto IA et al. Differential effects of cystathionine-gamma-lyase-dependent vasodilatory H2S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas. PLoS One, 2012; 7: e41951.

52. Predmore BL, Kondo K, Bhushan S et al. The polysulfide diallyl trisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and increasing nitric oxide bioavailability. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012; 302: H2410-8.

53. Wang Q, Liu HR, Mu Q et al. S-propargyl-cysteine protects both adult rat hearts and neonatal cardiomyocytes from ischemia/hypoxia injury: the contribution of the hydrogen sulfide-mediated pathway. J Cardiovasc Pharmacol, 2009; 54: 139-46.

54. Huang Q, Sparatore A, Del Soldato P et al. Hydrogen sulfide releasing aspirin, ACS14, attenuates high glucose-induced increased methylglyoxal and oxidative stress in cultured vascular smooth muscle cells. PLoS One, 2014; 9: e97315.

55. Mani S, Li H, Untereiner A et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. Circulation, 2013; 127: 2523-34.

56. Bos EM, Wang R, Snijder PM et al. Cystathionine gamma-lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress. J Am Soc Nephrol, 2013; 24: 759-70.

57. Asimakopoulou A, Panopoulos P, Chasapis CT et al. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine beta synthase (CBS) and cystathionine gamma lyase (CSE). Br J Pharmacol, 2013; 169: 922-32.

58. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiol Rev, 2012; 92: 791-896.

59. Liu YT. Hydrogen Sulfide: Physiological and Pathophysiological Functions. Hydrogen Sulfide and its Therapeutic Applications, 2013.

60. Yong QC, Pan TT, Hu LF, Bian JS. Negative regulation of beta-adrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. J Mol Cell Cardiol, 2008; 44: 701-10.

61. Sun YG, Cao YX, Wang WW et al. Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. Cardiovasc Res, 2008; 79: 632-41.

62. Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V et al. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010; 30: 1998-2004.

63. Holwerda KM, Karumanchi SA, Lely AT. Hydrogen sulfide: role in vascular physiology and pathology. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2015; 24: 170-6.

64. Kondo K, Bhushan S, King AL et al. H(2)S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. Circulation, 2013; 127: 1116-27.

65. Jiang HL, Wu HC, Li ZL et al. [Changes of the new gaseous transmitter H2S in patients with coronary heart disease]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2005; 25: 951-4.

66. 43 B, Adaikan PG, Moore PK. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction--a pilot study. Eur J Pharmacol, 2006; 535: 280-2.

67. Shukla N, Rossoni G, Hotston M et al. Effect of hydrogen sulphide-donating sildenafil (ACS6) on erectile function and oxidative stress in rabbit isolated corpus cavernosum and in hypertensive rats. BJU international, 2009; 103: 1522-9.

68. Xue R, Hao DD, Sun JP et al. Hydrogen sulfide treatment promotes glucose uptake by increasing insulin receptor sensitivity and ameliorates kidney lesions in type 2 diabetes. Antioxid Redox Signal, 2013; 19: 5-23.

69. Brancaleone V, Roviezzo F, Vellecco V et al. Biosynthesis of H2S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. British journal of pharmacology, 2008; 155: 673-80.

70. Huang YM, Xia JY, Jiang R. [düs]. Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology, 2014; 20: 299-303.

71. Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, Boger RH. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. Vasc Med, 2002; 7: 213-25.

72. Besiroglu H, Otunctemur A, Ozbek E. The relationship between metabolic syndrome, its components, and erectile dysfunction: a systematic review and a meta-analysis of observational studies. J Sex Med, 2015; 12: 1309-18.

73. Kaya E, Sikka SC, Gur S. A comprehensive review of metabolic syndrome affecting erectile dysfunction. J Sex Med, 2015; 12: 856-75.

74. Huey W. The Metabolic Syndrome: What Have We Learned? J Chin Med Assoc, 2004.

75. Cozma A, Orasan O, Sampelean D et al. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome. Rom J Intern Med, 2009; 47: 133-40.

76. Ghezzi AC, Cambri LT, Botezelli JD et al. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. Diabetology & metabolic syndrome, 2012; 4: 16.

77. Arslan M, Atmaca A, Ayvaz G, Başkal N. METABOLİK SENDROM KILAVUZU. TÜRKİYE ENDOKRİNOLOJİ ve METABOLİZMA DERNEĞİ 2009.

78. Üçler R. Metabolik Sendrom Tıp Araştırmaları Dergisi, 2014: 153-7

79. Chiou WF, Liu HK, Juan CW. Abnormal protein expression in the corpus cavernosum impairs erectile function in type 2 diabetes. BJU international, 2010; 105: 674-80.

80. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. Nutrition & metabolism, 2016; 13: 15.

81. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. Nutrition, 2010; 26: 1044-9.

82. Troiano RP, Briefel RR, Carroll MD, Bialostosky K. Energy and fat intakes of children and adolescents in the united states: data from the national health and nutrition examination surveys. The American journal of clinical nutrition, 2000; 72: 1343S-53S.

83. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. Hypertension, 2000; 35: 1009-15.

84. Rho YH, Zhu Y, Choi HK. The epidemiology of uric acid and fructose. Seminars in nephrology, 2011; 31: 410-9.

85. Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. Molecular and cellular biochemistry, 2009; 332: 145-59.

86. de Moura RF, Ribeiro C, de Oliveira JA et al. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. The British journal of nutrition, 2009; 101: 1178-84.

87. Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR et al. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. BioMed research international, 2014; 2014: 263897.

88. Padiya R, Khatua TN, Bagul PK et al. Garlic improves insulin sensitivity and associated metabolic syndromes in fructose fed rats. Nutrition & metabolism, 2011; 8: 53.

89. Yang G, Wu L, Jiang B et al. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science, 2008; 322: 587-90.

90. Al-Magableh MR, Kemp-Harper BK, Hart JL. Hydrogen sulfide treatment reduces blood pressure and oxidative stress in angiotensin II-induced hypertensive mice. Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension, 2015; 38: 13-20.

91. Wu L, Yang W, Jia X et al. Pancreatic islet overproduction of H2S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2009; 89: 59-67.

92. Lefer DJ. Potential importance of alterations in hydrogen sulphide (H2S) bioavailability in diabetes. British journal of pharmacology, 2008; 155: 617-9.

93. Yusuf M, Kwong Huat BT, Hsu A et al. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. Biochemical and biophysical research communications, 2005; 333: 1146-52.

94. Zhang Y, Yang J, Wang T et al. Decreased Endogenous Hydrogen Sulfide Generation in Penile Tissues of Diabetic Rats With Erectile Dysfunction. The journal of sexual medicine, 2016; 13: 350-60.

8. EKLER

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 04/19/2014
Toplantı Tarihi : 14 Ekim 2014

Sayın, Doç.Dr.Nergiz MURAT
Farmakoloji Anabilim Dalı

57/2014 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz **"Metabolik Sendromda Erektil Yanıtlar H2S ile değişiyor mu?"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK
Üye

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.M.Ensari GÜNELİ
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Meral KARAMAN
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCİ
Üye (Topl.Katılamadı)

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Zehra KINAM
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

ÖZGEÇMİŞ

EZGİ DAYAR

TC Kimlik No / Pasaport No:	11584581632
Doğum Yılı:	1989
Yazışma Adresi :	Esenyalı Mah. 52/72 Sk. No:33 D:8 Karabağlar/İZMİR
Telefon :	0555 566 25 77
e-posta :	ezgidayar@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Farmakoloji	Yüksek Lisans	2016
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2013

YAYINLARI

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Ezgi Dayar, Erkan Kara, Gunay Yetik Anacak, Nil Hocaoglu, Ozan Bozkurt, Sedef Gidener, Nergis Durmus. **Do penile hemodynamics change in the presence of hydrogen sulphide (H_2S) donor in the metabolic syndrome-induced erectile dysfunction?** *7th European Congress of Pharmacology, 26-30 June 2016, İstanbul*. Sözlü Sunum

Erkan Kara, Erkan Kahraman, Ezgi Dayar, Gunay Yetik Anacak, Omer Demir, Nese Atabey, Sedef Gidener, Nergis Durmus. **The effect of ''Boldine'' on metabolic syndrome induced erectile dysfunction.** 7th *European Congress of Pharmacology, 26-30 June 2016, İstanbul.* Poster Sunumu