

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS)

**HİDROJEN SÜLFÜRÜN İZOLE SIĞIR RETİNAL ARTERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

GÖĞEM ZEYNEP ORTAKÖYLÜ

**DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. SELÇUK TAKIR**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

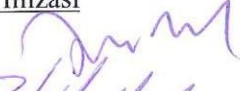
İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Göğem Zeynep Ortaköylü tarafından hazırlanan "Hidrojen Sülfürün İzole Sığır Retinal Arteri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

10 / 01 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Fatma AKAR Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AbD	
2.Prof Dr. Zeliha YAZICI İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AbD	
3.Prof. Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AbD	
4.Yard. Doç. Dr. Selçuk TAKIR İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AbD	
5.Yard. Doç. Dr. İlkey ALP YILDIRIM İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AbD	

BEYAN

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

Göğem Zeynep Ortaköylü

(İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

*Çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren ve destek olan danışman hocam
Yard. Doç. Dr. Selçuk Takır'a,*

*Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yanımda olan Anabilim Dalı Başkanımız
Prof. Dr. Sönmez Uydeş Doğan'a,*

*Bana her zaman destek veren değerli hocalarım Doç. Dr. Alper Okyar'a, Doç. Dr.
Gökçe Topal Tanyılmaz'a, Yard. Doç. Dr. İlkay Alp Yıldırım'a, Yard. Doç. Dr. Deniz
Kaleli Durman, Araş. Gör. Dr. Zeliha Pala Kara ve Araş. Gör. Dr. Nihan Çarçak'a,*

*Yüksek lisans eğitimim boyunca dostluklarını ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen
sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Narin Öztürk'e, Uzm. Ecz. İsmail Hakkı Altun'a, Uzm.
Ecz. Gülsev Özen'e, Ecz. Dilek Öztürk'e, Ecz. Selin Yamakoğlu'na ve Ecz. Ayça
Toprak'a,*

*Deneylerimde kullandığım preparatların temininde yardımcı olan Dostlar Et ve
Et Mamülleri A.Ş. sorumlu müdürleri ve çalışanlarına,*

Bana daima destek olan çok sevdiğim aileme

Teşekkür ederim...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: BYP 29708

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hidrojen Sülfür'ün Genel Özellikleri ve Fizyolojik Rolü	3
2.1.1. Hidrojen Sülfür'ün Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri.....	6
2.1.1.1. Hidrojen Sülfür'ün Ateroskleroz Oluşumuna Etkileri	8
2.1.2. Hidrojen Sülfür'ün Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri	10
2.1.3. Hidrojen Sülfür'ün Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	10
2.1.4. Hidrojen Sülfür'ün Göz Üzerine Etkileri.....	12
2.1.4.1. Göz Anatomisi	12
2.1.4.2. Gözün Retina Tabakası	14
2.1.4.3. Retinanın Kanlanması	16
2.1.4.4. Retinal Arterlerin Endotel ve Düz Kas Fonksiyonu	18
2.1.4.5. Retinal Arterlerin Tonüsünün Düzenlenmesi.....	19
2.1.4.6. Hidrojen Sülfürün Göz ve Retinal Kan Akımı Üzerine Etkileri	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri.....	27
3.2. Araç ve Gereçler	27
3.3. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları	28
3.4. İzole Sığır Retinal Arterlerinin Hazırlanması	29
3.5. Yöntem.....	30

3.5.1. Retinal Arterlerin Standardizasyonu ve Endotel ve Düz Kas Gevşeme Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	30
3.5.2. Sığır Retinal Arterinde Hidrojen Sülfür'ün Etkisinin İncelenmesi.....	31
3.5.3. Sığır Retinal Arterinde Hidrojen Sülfür'ün Etki Mekanizmasının İncelenmesi.....	31
3.6. İstatistiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1.1. İzole Sığır Retinal Arterlerinin Endotel ve Düz Kas Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi	34
4.1.2. Asetilkolinin Etkisi	34
4.1.3. Sodyum Nitroprusiyatın Etkisi.....	34
4.2. Hidrojen Sülfür'ün Etkisinin İncelenmesi	36
4.2.1. PGF _{2α} (3x10 ⁻⁵ M) ile Prekontrakte Edilmiş Retinal Arterleri Üzerine NaHS'in (10 ⁻⁶ -3x10 ⁻³ M) Etkisi.....	36
4.2.2. K ⁺ (100 mM) ile Prekontrakte Edilmiş Retinal Arterleri Üzerine NaHS'in (10 ⁻⁶ -3x10 ⁻³ M) Etkisi.....	36
4.3. NaHS'in Retinal Arteri Gevşetici Etkisinin Mekanizmasının İncelenmesi.....	38
4.3.1. Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktörlerin Etkisi	38
4.3.1.1. Siklooksijenaz İnhibitörü İndometazin'in Etkisi.....	38
4.3.1.2. Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörü L-NOARG'ın Etkisi	38
4.3.1.3. Guanilat Siklaz İnhibitörü ODQ'nun Etkisi.....	39
4.3.1.4. Endotel Tabakasının Mekanik Olarak Tahrip Edilmesinin Etkisi	41
4.3.2. Potasyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi.....	43
4.3.2.1. K _{ATP} Kanalı İnhibitörü Glibenklamidin Etkisi.....	43
4.3.2.2. SK _{Ca} ⁺⁺ Kanalı İnhibitörü Apaminin Etkisi	45
4.3.2.3. K _v İnhibitörü 4-aminopiridin'in Etkisi.....	46
4.3.2.4. K _{ir} İnhibitörü BaCl ₂ Etkisi	47
4.3.3. L- Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi.....	49
4.3.4. Adenilat Siklaz İnhibitörü SQ 22536'nın Etkisi.....	51
4.3.5. Hidrojen Sülfürün Spazmojen Ajanların Kasılma Yanıtları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	54
4.3.5.1. PGF _{2α} (10 ⁻⁸ -10 ⁻⁴ M) Konsantrasyon-Yanıt Eğrisi Üzerine Etkisi.....	54
4.3.5.2. K ⁺ (10-100 mM) Konsantrasyon-Yanıt Eğrisi Üzerine Etkisi.....	56
5. TARTIŞMA.....	58

KAYNAKLAR	64
ETİK KURUL KARARI	77
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: PGF _{2α} (3x10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10 ⁻⁶ -3x10 ⁻³ M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10 ⁻⁵ M, 20 dk), nitrik oksit sentetaz inhibitörü L-NOARG (10 ⁻⁴ M, 20 dk), guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun (10 ⁻⁵ M, 20 dk) veya damarların endotel tabakasının mekanik olarak tahrip edilmesinin etkisi.....	42
Tablo 4-2: PGF _{2α} (3x10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10 ⁻⁶ -3x10 ⁻³ M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine K _{ATP} inhibitörü glibenklamidin (10 ⁻⁵ M, 20 dk), SK _{Ca⁺⁺} inhibitörü apaminin (3x10 ⁻⁷ M, 20 dk), K _v inhibitörü 4-aminopiridin (2x10 ⁻³ M, 20 dk) ve K _{ir} inhibitörü BaCl ₂ 'nin (10 ⁻² M, 20 dk) etkisi.....	48
Tablo 4-3: PGF _{2α} (3x10 ⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10 ⁻⁵ -3x10 ⁻³ M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı inhibitörü nifedipinin (10 ⁻⁵ M, 20 dk) ve adenilat siklaz inhibitörü SQ 22536'nın (10 ⁻⁵ M, 20 dk) etkisi.	53
Tablo 4-4: İzole sığır retinal arterlerinin NaHS (3x10 ⁻³ M, 20dk) ile inkübasyonunun PGF _{2α} (10 ⁻⁸ -10 ⁻⁴ M) ve K ⁺ (10-100mM) ile elde edilen E _{maks} ve pEC ₅₀ değerlerine etkisi.	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Gözün anatomisi.....	13
Şekil 2-2: Retinanın hücre katmanlarının görüntüsü.	15
Şekil 2-3: Merkezi retinal arter ve venin şematik gösterimi.....	17
Şekil 4-1: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak A) asetilkolin (Ach; 10^{-8} - 10^{-4} M) ve B) sodyum nitroprusiyat (SNP; 10^{-8} - 10^{-4} M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.	35
Şekil 4-2: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ve K^+ (100mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3}M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.	37
Şekil 4-3: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3}M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine siklooksijenaz inhibitörü indometazin ($10^{-5}M$, 20 dk), nitrik oksit sentetaz inhibitörü L-NOARG ($10^{-4}M$, 20 dk), guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun ($10^{-5}M$, 20 dk) etkisi.	40
Şekil 4-4: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3}M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine damarların endotel tabakasının mekanik olarak tahrip edilmesinin etkisi.	41
Şekil 4-5: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3}M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine K_{ATP} inhibitörü glibenklamidin (10^{-5} M, 20 dk) etkisi.	44
Şekil 4-6: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3}M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine $SK_{Ca^{++}}$ inhibitörü apaminin ($3 \times 10^{-7}M$, 20 dk) etkisi.....	45
Şekil 4-7: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3}M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine K_v inhibitörü 4-aminopiridinin ($2 \times 10^{-3}M$, 20 dk) etkisi.....	46
Şekil 4-8: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3}M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine K_{ir} inhibitörü $BaCl_2$ 'nin ($10^{-2}M$, 20 dk) etkisi.....	47

- Şekil 4-9: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} \text{M}$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı inhibitörü nifedipinin (10^{-5}M , 20 dk) etkisi..... 50
- Şekil 4-10: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} \text{M}$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine adenilat siklaz inhibitörü SQ 22536'nın (10^{-5}M , 20 dk) etkisi. 52
- Şekil 4-11: İzole sığır retinal arterlerinin NaHS ($3 \times 10^{-3} \text{M}$, 20dk) ile inkübasyonunun $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-8} - 10^{-4}M) ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine etkisi..... 55
- Şekil 4-12: İzole sığır retinal arterlerinin NaHS ($3 \times 10^{-3} \text{M}$, 20dk) ile inkübasyonunun K^+ (10-100 mM) ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine etkisi..... 56

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- [Ca⁺⁺]_i= Hücre içi kalsiyum
3-MST=3-merkaptο sülfür transferaz
4-AP= 4-aminopiridin
Ach= Asetilkolin
AS= Adenilat siklaz
BaCl₂= Baryum klorür
Ca⁺⁺/CaM= Kalsiyum/Kalmodulin
Ca⁺⁺= Kalsiyum
CAT= Sistein amino transferaz
CBS= Sistasyonin beta sentaz
CGPR= Kalsitonin gen bağımlı peptit
CO= Karbon monoksit
CSE= Sistasyonin gamma liyaz
DAO= D-aminoasit oksidaz
ET-1= Endotelin-1
ET_A= Endotelin A reseptör alt tipi
ET_{B1}= Endotelin B1 reseptör alt tipi
ET_{B2}= Endotelin B2 reseptör alt tipi
GABA= Gamma amino bütirik asit
GS= Guanilat siklaz
H₂S= Hidrojen sülfür
IMA= İnternal meme arteri
K⁺= Potasyum
K_{ATP}= ATP-duyarlı potasyum kanalı
K_{ir}= İçer akım potasyum kanalı
K_v= Voltaj-bağımlı potasyum kanalı
KCl= Potasyum klorür
L-NAME= nitro-L-arjinin metil ester

- L-NMMA=L-N^G-monometil arjinin
L-NOARG= N^G-nitro-L-Arginin
LTP= Long Term Potentiation (Uzun süreli potensiyalizasyon)
NA= Noradrenalin
NaHS= Sodyum hidrosülfit
NMDA= N-metil D-aspartat
NO= Nitrik oksit
NOS= Nitrik oksit sentetaz
ODQ=1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3-a]Quinoxalin-1-One
PDE-5= Fosfodiesteraz-5
PGF_{2α}= Prostaglandin F_{2α}
PGI₂= Prostaglandin
PLP= Piridoksal-5-fosfat
ROS= Reaktif oksijen türevleri
RRF= Retinal gevşetici faktör
sAMP/PKA= Siklik adenzin monofosfat/Protein kinaz A
sAMP= Siklik adenzin monofosfat
sGMP= Siklik guanozin monofosfat
SK_{Ca}⁺⁺= Küçük kondüktanslı voltaj-bağımlı potasyum kanalı
SNP= Sodyum nitroprussiyat
Tx_{A2}=Tromboksan A₂
α-KG= α-Ketoglutarat

ÖZET

Ortaköylü, G.Z. (2014). Hidrojen Sülfürün Sığır Retinal Arteri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Hidrojen sülfür (H_2S), endojen olarak gözünün çeşitli dokularında ve yüksek oranda da retina tabakasında üretilmektedir. Bununla birlikte, retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde görev alıp almadığı bilinmemektedir. Çalışmamızda, hidrojen sülfürün izole sığır retinal arteri üzerine etkisi ve etki mekanizması araştırılmıştır. Bu amaçla, hidrojen sülfürün retinal arterler üzerine direkt ve preventif etkileri H_2S donörü, sodyum hidrosülfid (NaHS) kullanılarak test edilmiştir. Ardından, hidrojen sülfürün etki mekanizmasında, nitrik oksit ve siklooksijenaz yolağının vazodilatatör faktörleri ile ATP-duyarlı potasyum kanalı (K_{ATP}), voltaj-bağımlı potasyum kanalı (K_v), küçük kondüktanslı voltaj-bağımlı potasyum kanalı ($SK_{Ca^{++}}$), içe akım potasyum kanalı (K_{ir}), L-tipi voltaj-bağımlı kalsiyum kanalı ve adenilat siklaz yolağının rolü incelenmiştir. NaHS, $100 \mu M$ 'ın üzerinde konsantrasyonlarında hem $PGF_{2\alpha}$ hem de K^+ ile prekontrakte retinal arterlerde gevşeme yanıtına neden olduğu ve damarlar NaHS ile inkübe edildiğinde $PGF_{2\alpha}$ ve K^+ ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtının belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. NaHS'in retinal arterler üzerine gevşetici etkisinin nitrik oksit sentetaz, guanilat siklaz, siklooksijenaz, adenilat siklaz, K_{ATP} , $SK_{Ca^{++}}$, L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanallarının inhibitörleri varlığında veya damarların endotel tabakası tahrip edildiğinde, değişmediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, K_v inhibitörü 4-aminopiridin veya K_{ir} inhibitörü $BaCl_2$ varlığında NaHS'in retinal arterler üzerine gevşetici etkisi belirgin bir şekilde azalmıştır. Bulgularımız, hidrojen sülfürün K_v ve K_{ir} kanallarının aktivasyonu aracılığıyla retinal arter tonüsün düzenlenmesinde rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hidrojen sülfür, NaHS, retinal arter, gevşeme, K_v kanalları, K_{ir} kanalları

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: BYP 29708

ABSTRACT

Ortaköylü, G.Z. (2014). The effects of hydrogen sulfide on isolated bovine retinal arteries. Istanbul University, Institute of Health Science, Pharmacology Department. Master Thesis. İstanbul.

Hydrogen sulfide (H_2S) is produced endogenously in ocular tissues with the highest levels in retina. However, it is unclear whether it can modulate retinal arterial tone or not. Herein we aimed to investigate the effectiveness and the mechanism of action of H_2S in isolated bovine retinal arteries. For this purpose, the direct and preventive effects of H_2S were tested comparatively in retinal arteries by using its donor, sodium hydrosulfide (NaHS). Thereafter, in the mechanism of action of H_2S , the role of nitric oxide and endothelial vasodilators of cyclooxygenase pathway as well as ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}), voltage-dependent potassium channel (K_v), small-conductance voltage-dependent potassium channel ($SK_{Ca^{++}}$), inwardly rectifying potassium channels (K_{ir}), L-type calcium channel and adenylate cyclase pathway were evaluated. NaHS displayed relaxation responses in both $PGF_{2\alpha}$ and K^+ precontracted retinal arteries over the concentration of 100 μM . Also, in the presence of NaHS, the maximum contractile responses to $PGF_{2\alpha}$ and K^+ were significantly reduced. Neither the presence of known inhibitors of nitric oxide synthase, guanylate cyclase, cyclooxygenase, adenylate cyclase, K_{ATP} , $SK_{Ca^{++}}$, L-type voltage gated calcium channels nor removal of endothelium modified relaxation response to NaHS in retinal arteries. A remarkable inhibition was observed in the presence of K_v channel inhibitor 4-aminopyridine or K_{ir} channel inhibitor $BaCl_2$. Our results suggested that H_2S might play a role in the regulation of retinal arterial tone by acting via activation of K_v and K_{ir} channels.

Key Words: Hydrogen sulfide, NaHS, retinal artery, relaxation, K_v channel, K_{ir} channel
The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. B.Y.P 29708

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uzun yıllar toksik bir madde olarak bilinen hidrojen sülfürün (H_2S), memelilerde kalp, damar, beyin, böbrek, gastrointestinal sistem vb birçok organ ve dokuda sentezlendiği ve çeşitli fizyolojik olaylarda görev aldığı ortaya konmuştur. H_2S memeli hücrelerinde endojen olarak, piridoksal-5'-fosfat bağımlı enzimler sistasyonin beta sentaz (CBS) ve sistasyonin-gamma liyaz (CSE) tarafından genel olarak L-sisteinden ve daha az olarak da homosisteinden sentezlenmektedir. H_2S 'in α -ketoglutarat bağımlı enzimler olan sistein amino transferaz (CAT) ve 3-merkaptosülfür transferaz (3-MST) aracılığı veya non-enzimatik yolla inorganik polisülfidlerin yıkımıyla sentezlendiği de bildirilmiştir. H_2S 'in memeli hücrelerinde oluşturduğu etki ve bu etkinin mekanizması, etkilediği sistem ve doku türüne göre farklılık göstermektedir. H_2S ; kan basıncını düşürücü, damar gevşetici, kalbi koruyucu, ateroskleroz oluşumunu engelleyici, gastrointestinal kasları gevşetici, ağrı duyumsamasını engelleyici, santral sinir sisteminde nöromodülatör ve nöroprotektan vb etki göstermektedir. Bununla birlikte, H_2S 'in gözdeki mevcudiyeti ve fizyolojik etkileri ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. İzole sığır gözünde yapılan çalışmalarda H_2S 'in birçok göz dokusuyla birlikte kornea ve retinada yüksek düzeyde bulunduğu bildirilmiştir. H_2S 'in oküler dokularda varlığının tespit edilmesinin ardından izole domuz iris siliyer cisimciklerinde CSE ve CBS enzimleri aracılığıyla üretilen H_2S 'in sempatik nörotransmisyonu inhibe ederek gevşeme yanıtına neden olduğu gösterilmiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda gözün çeşitli dokularında ve retinasında sentezlendiği ve serbestlendiği gösterilmiş H_2S 'in retinal arter tonüsü üzerine etkisini incelemeyi amaçladık. Bu amaçla prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterlerinde H_2S donörü, NaHS'in etkisi araştırılmış ardından görülen etkide; endotel kaynaklı gevşetici faktörler olan nitrik oksit (NO) ve siklooksijenaz yolağının vazodilatatör ürünlerinin rolü incelenmiştir. Daha sonra NaHS'in etkisinin ATP-duyarlı potasyum kanalı (K_{ATP}), küçük kondüktans kalsiyum ile aktive potasyum kanalı ($SK_{Ca^{++}}$), voltaj bağımlı potasyum kanalı (K_v) ile içe akım potasyum kanalı (K_{ir}), L-tipi voltaj bağımlı

kalsiyum kanalı ve adenilat siklaz yolağı ile ilişkisi araştırılmıştır. Ayrıca, NaHS'in izole sığır retinal arterlerinin vasküler reaktivitesi üzerine preventif etkisi test edilmiştir. Bulgularımız, H₂S'in K_v veya K_{ir} kanallarının aktivasyonu aracılığıyla retinal arter tonüsün düzenlenmesinde rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hidrojen Sülfür'ün Genel Özellikleri ve Fizyolojik Rolü

Hidrojen sülfür (H_2S), maruziyeti sonucu konjonktivada irritasyon, akciğer hasarı ve solunum depresyonu gibi etkileri olan renksiz, yanıcı, suda çözünebilen ve karakteristik güçlü çürük yumurta kokusuna sahip uzun yıllar boyunca toksik olarak bilinen ve memelilerde endojen olarak üretilen bir gazotransmitter olarak tanımlanmaktadır (Liu ve ark. 2012). H_2S 'in, havada $<0,1$ ppm yoğunluktaki kokusunun insanlar tarafından hissedilebildiği, bu kokunun 5-25 ppm yoğunlukta ciddi rahatsız edici hale geldiği ve 700 ppm üzerinde ise insanlarda bilinç kaybı ve ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Hughes ve ark. 2009).

H_2S , memeli hücrelerinde endojen olarak, piridoksal-5'-fosfat bağımlı enzimler sistasyonin beta sentaz (CBS) ve sistasyonin-gamma liyaz (CSE) tarafından genel olarak L-sisteinden ve daha az olarak da homosisteinden sentezlenmektedir (Li ve ark. 2006). H_2S 'in α -ketoglutarat bağımlı enzimler olan sistein amino transferaz (CAT) ve 3-merkaptosülfür transferaz (3-MST) aracılığı veya non-enzimatik yolla inorganik polisülfidlerin yıkımıyla sentezlendiği de bildirilmiştir (Shibuya ve ark. 2009). Yakın zamanda H_2S 'in sentezlenmesinde yeni bir yolun daha olduğu ortaya konulmuş olup D-sisteinden 3-MST aracılığıyla D-aminoasit oksidaz (DAO) enzimi varlığında da H_2S 'in üretildiği gösterilmiştir (Kimura 2013). Bu enzimlerden CAT ve 3-MST hem mitokondri hem de sitozolde, CSE ve CBS ise sadece sitozolde bulunmaktadır. H_2S türe ve organa bağlı olarak mitokondri veya sitozolde sentezlenmektedir (Kamoun 2004).

CBS enzimi büyük miktarlarda beyinde bulunurken; CSE ise daha çok periferel dokular, özellikle karaciğer, böbrek ve kan damarlarında bulunmaktadır (Li ve ark. 2006). CAT ve 3-MST'nin aorta ve beyinde bulunduğu ve damar endoteli ile beyin nöronlarında H_2S üretimini sağladığı bildirilmiştir (Shibuya ve ark. 2009). Bazı organlar

bu enzimlerden başlıca birini eksprese ederken (örn. kalpte CSE), bazı organ ve dokularda ise birden fazla sayıda H_2S sentezleyen enzim bulunmaktadır (örn. karaciğer). Kobaylarda yapılan bir çalışmada, CBS enziminin ileumda; CSE enziminin ise ileumun yanı sıra, portal ven ve torasik aorta da bulunduğu bildirilmiştir (Hosoki ve ark. 1997). Bir diğer çalışmada ise CBS enziminin mRNA'sının sıçan beyinde, özellikle hipokampus ve serebellumda eksprese olduğu, CSE mRNA'sının beyindeki varlığının tespit edilemediği bildirilmiştir (Abe ve Kimura 1996).

H_2S dolaşım sistemi ve dokularda mikromolar düzeyinde bulunmaktadır. Örneğin, sıçan ve insan plazmasında yaklaşık olarak $50 \mu M$ düzeyinde H_2S bulunduğu gösterilmiştir (Li ve ark. 2006). Modifiye sülfid elektrodu ile sıçan serumunda ölçülen H_2S seviyesi yaklaşık $45 \mu M$ olarak belirlenmiştir (Zhao ve ark. 2001). Sodyum hidrosülfid ($NaHS$) çok sayıda araştırmacı tarafından kullanılan, uygulaması kolay, stabil ve suda çözünabilir bir H_2S donörüdür. $NaHS$ çözündüğünde, Na^+ ve HS^- 'ye dissosiyasyon olur ve daha sonra HS^- , H^+ iyonu ile reaksiyona girerek H_2S oluşturur. Serbest H_2S , $NaHS$ 'in molar konsantrasyonunun yaklaşık olarak %30'una denk gelmektedir (Zhao ve Wang 2002).

H_2S 'in canlılarda çok sayıda fizyolojik olayda çeşitli etki gösterdiği bilinmektedir. H_2S 'in etki mekanizması damar yatağı türüne ve deney koşullarına göre çeşitlilik göstermektedir (Li ve ark. 2006). Kardiyovasküler sistemde; *in vivo* olarak uygulanan H_2S , K_{ATP} kanalları aracılığı ile kan basıncında düşmeye neden olmaktadır (Zhao ve ark. 2001). H_2S , myokard kontraktilesini de *in vivo* ve *in vitro* olarak kısmen K_{ATP} kanalını aktive ederek azaltmaktadır (Geng ve ark. 2004). Bunlara ek olarak, H_2S 'in kardiyoprotektif olduğu bildirilmiştir. H_2S myokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında K_{ATP} kanallarını aktive ederek koruyucu etki göstermektedir (Johansen ve ark. 2006). Ventriküler miyositlerde ise H_2S ile ön koşullama (preconditioning) uygulamasının protein kinaz C'yi aktive ettiği gözlemlenmiştir (Bian ve ark. 2006).

H_2S damarlarda düşük konsantrasyonlarında NO sentezini engellemesi sonucu kasılma yanıtı ortaya çıkarırken; yüksek konsantrasyonlarında ise doğrudan K_{ATP} kanalları (Zhao ve ark. 2001), K_v kanalları (Cheang ve ark. 2010), SK_{Ca}^{++} , IK_{Ca}^{++}

kanallarını (Zhao ve Wang 2002; Cheng ve ark. 2004) aktive ederek veya L-tipi Ca^{++} kanallarını (Sun ve ark. 2008; Tian ve ark. 2012) bloke etmesi sonucu hücre içine kalsiyum girişini engelleyerek gevşeme yanıtına neden olmaktadır. Bazı çalışmalarda ise H_2S 'in damarlarda, endotel bağımlı (NO, PGI_2 vb. aracılığı ile) olarak (Zhao ve Wang 2002) veya asidifikasyona neden olarak (Lee ve ark. 2007; Kiss ve ark. 2008) gevşeme yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir. H_2S 'in fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek, siklik guanozin monofosfat'ın (sGMP) hücre içi konsantrasyonunu arttırmak suretiyle vazorelaksan etki oluşturduğu (Bucci ve ark. 2010) ve vazorelaksan etkisinin NO ile sinerjistik şekilde arttığı da bildirilmiştir (Hosoki ve ark. 1997).

H_2S 'in damar duvarına direkt etkisinin olması ateroskleroz lezyonlarının oluşumunun engellenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmüştü (Lowicka ve Beltowski 2007) ve H_2S 'in ateroskleroz sürecinde damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı (Du ve ark. 2004; Mani ve ark. 2013) ve antiinflamatuvar (Qiao ve ark. 2010) etki gösterdiği ileri sürülmüştür.

H_2S 'in gastrointestinal sistemde de sentezlendiği bildirilmiştir (Distrutti ve ark. 2005). H_2S , gastrointestinal düz kaslarda düşük konsantrasyonlarda uygulandığında kasılma yanıtı ve yüksek konsantrasyonlarında K_{ATP} aracılı gevşeme yanıtı oluşturmuştur (Zhao ve ark. 2009). Yapılan bir başka çalışmada da H_2S 'in gastrointestinal sisteminde NO ve K_{ATP} kanalları aracılı gastrointestinal spazmlar sonucu oluşan ağrıları giderici (antinosiseptif) etki gösterdiği de bildirilmiştir (Distrutti ve ark. 2005).

H_2S aynı zamanda antioksidan özelliğindedir ve santral sinir sisteminde bir nöroprotektan ve nöromodülatör olarak da görev yapmaktadır (Njie-Mbye ve ark. 2010). H_2S antioksidatif etkisini reaktif oksijen türevleri (ROS) ile reaksiyona girerek göstermektedir (Lowicka ve Beltowski 2007). H_2S , N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerine bağlanarak siklik adenosin monofosfat (sAMP)'ı aktive etmekte ve bir sinyal molekülü gibi çalışarak nöromodülatör görevi yapmaktadır (Kimura ve ark. 1999; Kamoun 2004).

2.1.1. Hidrojen Sülfür'ün Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

CSE kardiyovasküler sistemde H₂S sentezleyen başlıca enzimdir ve arterlerde oldukça fazla miktarda bulunur. Sıçanlara intravenöz bolus enjeksiyonu ile H₂S verilmesinin geçici olarak kan basıncını 12-30 mmHg kadar düşürdüğü ve bu etkisinin K_{ATP} kanal blokörü olan glibenklamid ile antagonize olduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2001). Yapılan bir çalışmada CSE geni silinmiş (CSE^{-/-}) farelerde spontan olarak hipertansiyon geliştiği ortaya konmuştur (Yang ve ark. 2008). H₂S'in kardiyovasküler sistemde vasküler tonüsün sağlanması ve korunmasında önemli rolü olduğu ortaya konmuştur (Zhao ve ark. 2001).

H₂S'in vazomodülatör etkileri konsantrasyon, tür ve doku tipini de kapsayan çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. H₂S'in insan izole pulmoner arterlerinde gevşemeye ve bronşiyal havayolu basıncında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Ariyaratnam ve ark. 2013). İnsan internal meme arterinde (internal mammary artery, IMA) yapılan bir çalışmada, IMA'da CSE mRNA'sı ve CSE proteinlerinin bulunduğu; fenilefrin ile prekontrakte edilmiş IMA'ların üzerine NaHS uygulanmasının düşük konsantrasyonlarında ilave kasılma yanıtına, yüksek konsantrasyonlarında ise gevşeme yanıtına neden olduğu ve bu yanıtın K_{ATP} kanal blokörü glibenklamid varlığında kısmen bloke olduğu bildirilmiştir (Webb ve ark. 2008). Yapılan bir başka çalışmada ise fenilefrin ile prekontrakte sıçan aortalarına NaHS uygulanmasının düşük konsantrasyonlarında ilave kasılma yanıtına, 100 µM ve daha yüksek konsantrasyonlarında ise gevşeme yanıtına neden olduğu gösterilmiştir (Ali ve ark. 2006). Aynı çalışmada, NaHS'in düşük konsantrasyonlarında görülen ilave kasılma yanıtının damarlar deendotelize edildiğinde veya nitrozotiyollerini nitrit veya nitrate dönüştüren CuSO₄ ile muamele edildiğinde ortadan kalktığı, NaHS'in yüksek konsantrasyonlarında oluşturduğu gevşetici etkinin ise K_{ATP} kanal inhibitörü glibenklamid varlığında azaldığı gösterilmiştir (Ali ve ark. 2006).

H₂S etkisi genellikle 200 µM ve üzeri konsantrasyonlarda görülmektedir, bu da insan ve hayvanlarda bulunduğu fizyolojik değer olan 30-60 µM'ın çok üzerindedir

(Richardson ve ark. 2000). Bu nedenle H_2S 'in damarlarda oluşturduğu gevşeme yanıtına eşlik eden endojen bir faktörün olup olmadığı düşünülmüş ve damarlardan salınan H_2S 'in fizyolojik rolünün direkt olarak damarları gevşetmek değil, NO'nun lokal konsantrasyonlarını düzenlemek olduğu öne sürülmüştür (Ali ve ark. 2006). Bu amaçla kobay torasik aortasında yapılan bir çalışmada NO donörü sodyum nitroprussitin H_2S 'in gevşetici etkisini potansiyelize ettiğini ve damarlarda gevşemeye neden olmayacak düzeyde H_2S donörü NaHS varlığında da sodyum nitroprussitin gevşetici etkisinin arttığı gösterilmiştir (Hosoki ve ark. 1997). H_2S ile NO arasında ilişkiyi ortaya koyan bir başka çalışmada ise, sığır aortası endotel hücrelerinin NaHS ile inkübe edilmesinin Ca^{++}/CaM aracılı bir mekanizma ile konsantrasyon-bağımlı bir şekilde NO üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Kida ve ark. 2013). Bir başka çalışmada ise, H_2S 'in etkisinde K_{ATP} kanalları aracılığıyla indüklenen sGMP yolağının da rolünün olduğu ileri sürülmüştür (Bucci ve ark. 2012).

H_2S donörü NaHS izole sıçan aorta halkalarında konsantrasyon-bağımlı gevşemeye neden olmaktadır ve bu etkisinin sıçan pulmoner arterine oranla daha güçlü olduğu belirtilmiştir (Sun ve ark. 2011). Sıçan aortasında yapılan benzer bir başka çalışmada ise NaHS'in damarlarda K_{ATP} kanallarını açarak hiperpolarizasyona neden olduğu ve konsantrasyon-bağımlı gevşeme oluşturduğu gösterilmiştir (Liu ve ark. 2012). Aynı çalışmada, NaHS'in in vivo uygulanmasının sıçanların kan basıncında da azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Benzer bulgular farklı damar yataklarında da elde edilmiş, perfüze sıçan mezenterik arterlerinde yapılan bir çalışmada ise, NaHS'in konsantrasyon-bağımlı gevşeme oluşturduğu ve bu etkisinin SK_{Ca}^{++} , IK_{Ca}^{++} ve K^+_{ATP} kanalları üzerinden CSE aracılığıyla olduğu ortaya konmuştur (Cheng ve ark. 2004). Sıçanlarda bir başka çalışmada da iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı infarkt alanını sınırlandırarak koruyucu etki gösterdiği ve bu etkinin kısmen K_{ATP} kanalları aracılı olduğu gösterilmiştir (Johansen ve ark. 2006).

H_2S 'in damar gevşetici etkisinde K_{ATP} ve K_{Ca}^{++} 'nin yanı sıra K_v kanallarının da rolünün olduğu bildirilmiştir (Martelli ve ark. 2013). Tromboksan A_2 analogu U46619 ile prekontrakte edilmiş olan endoteli sağlam olan veya deendotelize olan sıçan koroner arterlerinde yapılan bir çalışmada, H_2S donörü NaHS'in gevşetici etkisinin endotel ve

K_{ATP} kanalları aracılı olmadığı ancak gevşeme yanıtının K_v blokörü 4-aminopiridin uygulanması ile kısmen azaldığı bildirilmiştir (Cheang ve ark. 2010).

Serebral arterlerde yapılmış olan bazı çalışmalarda H_2S 'in etkisinin kalsiyum ve kalsiyum kanalları ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Sıçan serebral arterinde yapılan bir çalışmada, serebral arterlerin endotel ve düz kas tabakasında CSE enzimi bulunduğu ve ortama CSE substratı L-sistein konulmasının NaHS ile elde edilen gevşeme cevabında endotelyal vazodilatatör faktörlerden veya K_{ATP} , $K_{Ca^{++}}$, K_v , K_{ir} kanallarından bağımsız şekilde kısmen L-tipi Ca^{++} kanalları aracılığıyla artmaya neden olduğu bildirilmiştir (Streeter ve ark. 2012). İzole domuz serebral arteriyolünde yapılan bir diğer çalışmada ise, H_2S 'in hücre içindeki Ca^{++} akımını aktive ettiği ve bunun da vasküler düz kas hücrelerindeki Ca^{++} konsantrasyonunu düşürerek gevşeme yanıtına yol açtığı gösterilmiştir (Liang ve ark. 2012). Sıçan serebral arterlerinde yapılan bir diğer çalışmada da, hidrojen sülfür donörü olan NaHS'in başlıca arteriyel miyozitlerde bulunan L-tipi kalsiyum kanallarından gerçekleşen Ca^{++} influksunu inhibe ederek gevşeme oluşturduğu gözlemlenmiş ve L-sistein/CSE/ H_2S yolağının da serebral kan perfüzyonunda fizyolojik bir rolü olduğu sürülmüştür (Tian ve ark. 2012). Yine benzer şekilde H_2S 'in etkisinde pH'yı düzenleyen mekanizmalardan biri olan Cl^-/HCO_3^- iyon değiştiricisinin rolü incelenmiş ve H_2S 'in bu pompayı aktive ederek intraselüler asidifikasyonu arttırdığı ve damar gevşetici etkisine kısmen aracılık ettiği bildirilmiştir (Lee ve ark. 2007).

2.1.1.1. Hidrojen Sülfür'ün Ateroskleroz Oluşumuna Etkileri

Ateroskleroz; arterlerde oluşan, kronik, karmaşık yapıya sahip ve ilerleyici özellikte damar tıkanıklığına kadar yol açan bir patoloji olarak tanımlanmaktadır (Qiao ve ark. 2010). Ateroskleroz lezyonları başlıca büyük ve orta boyutta damarlarda görülmekte ve kalp, beyin ve ekstremitelerde enfarktüs ile sonuçlanan iskemiye neden olabilmektedir (Ross 2005). Damarlarda yüksek miktarda ve modifiye formda düşük yoğunluklu lipoprotein (low density lipoprotein, LDL) bulunması, sigara içmeye bağlı

olarak oluşan serbest radikaller, hipertansiyon, diyabet, genetik özellikler ve/veya başka faktörlerin kombinasyonu ile endotel disfonksiyonu meydana gelmektedir.

Plazmada mevcut olan homosistein seviyesinde görülen artış da ateroskleroz ile ilişkilendirilmektedir (Temple ve ark. 2000). Ayrıca, homosistein metabolizmasında rolü bulunan CBS ve metilentetrahidrofolat redüktaz gibi enzimlerin genetik olarak bulunmaması durumunda, damarlarda ileri derecede ateroskleroz oluşumu görüldüğü bildirilmiştir (Mudd ve ark. 1985). Kardiyovasküler sistemdeki hastalıkların birçoğunun oluşmasında rolü olduğu bilinen H₂S, aterosklerozun oluşum sürecinde de etki göstermektedir. H₂S; damar düz kaslarının proliferasyonu ve apoptozisi olaylarında rol oynamakta, hiperhomosisteinemi durumunun sürmesine etkide bulunmakta, LDL'nin aterojenik değişimini inhibe etmekte, damar kalsifikasyonunu baskılamakta ve inflamasyon durumunda antiinflamatuvar etki göstermektedir (Qiao ve ark. 2010).

H₂S'in antiaterosklerotik etkisinin mekanizması araştırıldığında, aterosklerozun patogenezinde çok önemli rol oynayan damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunun H₂S ile baskılandığı ileri sürülmüştür (Mani ve ark. 2013). H₂S'in aterosklerozda inflamasyon oluşumunu azalttığı, K_{ATP} kanallarının aktivasyonu ile ilişkili olarak lökosit infiltrasyonu ve adhezyonunu ortadan kaldırdığı ileri sürülmüştür (Zanardo ve ark. 2006). Buna ek olarak, aterosklerotik plaklarda yüksek düzeyde hücre içi adhezyon molekülü (intracellular adhesion molecule, ICAM) bulunması, bu faktörün ateroskleroz oluşumunda önemli bir yeri olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. ICAM-1 immunoglobulin süperfamilyasındandır ve damar lümenine inflamatuvar hücrelerinin adhezyonunun indüklenmesinde rol alır. H₂S'in ICAM-1'in regülasyonunda görevi olduğu ileri sürülmüştür. Bir çalışmada, apolipoprotein-E geni silinmiş farelerde ateroskleroz geliştiği ve bu aterosklerotik farelerin H₂S donörü olan NaHS ile tedavi edilmesi sonucunda, ICAM-1 oluşumunun baskılandığı ve ICAM-1 seviyesinin düştüğü görülmüştür (Wang ve ark. 2009).

2.1.2. Hidrojen Sülfür'ün Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri

H_2S 'in düz kaslar üzerinde düşük konsantrasyonlarda kastırıcı ve yüksek konsantrasyonlarda gevşetici etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu etkinin mekanizmasını incelemek amacıyla kobaylarda yapılan bir çalışmada, H_2S donörü olan NaHS'in düşük konsantrasyonlarda mide düz kasına uygulandığında, kasın kasılma amplitüdünü arttırdığı yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında ise spontan kasılmanın amplitüdünü baskıladığı gözlenmiştir. NaHS'in kobay mide düz kasında neden olduğu eksitator etkisinin K_v kanalları aracılığı ile inhibitör etkisinin ise K_{ATP} kanalları aracılı olarak meydana geldiği bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2009). 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit'in intrarektal olarak uygulanması ile indüklenen akut kolitli sıçanlarda yürütülen bir çalışmada da, hayvanları NaHS ile tedavi etmenin konsantrasyon-bağımlı olarak kolorektal distansiyon ile indüklenen ağrıda K_{ATP} ve NO aracılı antinosiseptif etki gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada H_2S 'in kolon ve spinal kordonda CSE ve CBS enzimleri ile endojen olarak sentezlendiğini ileri sürülmüştür. (Distrutti ve ark. 2005).

2.1.3. Hidrojen Sülfür'ün Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Yapılan çalışmalar sonucunda beyinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan H_2S 'in santral sinir sisteminde endojen olarak sentezlendiği ortaya konulmuştur (Kimura ve ark. 1999; Li ve ark. 2006; Shibuya ve ark. 2009). H_2S genellikle nöronlar ve astrositlerde bağlı sülfan sülfür formunda depolanmaktadır (Ishigami ve ark. 2009). Nöronal eksitasyon veya diğer stimülasyonlar sonucunda bağlı sülfan sülfürün ayrışarak serbest H_2S oluşumuna neden olduğu rapor edilmiştir (Tan ve ark. 2010).

H_2S 'in santral sinir sisteminde birçok fizyolojik olayda rol oynadığı ve bir nöromodülatör olarak görev yaptığı ileri sürülmektedir (Kamoun 2004). H_2S 'in nöromodülatör etkisinin N-metil D-aspartat reseptörlerinin aktivasyonunu artırarak uzun süreli potansiyalizasyonun (Long Term Potentiation, LTP) indüklenmesini kolaylaştırmak yoluyla olduğu gösterilmiştir (Kimura 2013). H_2S nöronal ve glial

hücrelerdeki H₂S'e özel reseptörlere bağlandıktan sonra, adenilat siklaz aktive olmakta ve sAMP üretilmektedir. Ardından artan sAMP protein kinaz A'yı aktive etmekte NMDA reseptörlerini fosforile ederek hipokampal LTP'yi indüklenmektedir. Glutamat aracılı olarak NMDA reseptörleri aracılığı ile nöromodülatör etki oluşturduğu bildirilen H₂S'in NMDA ile bağlantılı olarak gelişen nörodejeneratif hastalıklarda rolünün olabileceği düşünülmektedir. Yapılmış olan bir çalışmada, Alzheimer hastalarının beyindeki H₂S seviyelerinin kontrol grubuna göre %55 oranında düştüğü bildirilmiştir (Eto ve ark. 2002). Ayrıca bir diğer çalışmada Down Sendromlu kişilerde, aynı şekilde düzenlenmiş beslenme programı uygulanan kontrol grubuna göre idrar ile atılan H₂S metaboliti tiyosülfat seviyesinde ve eritrositlerde bulunan sülfhemoglobin düzeyinde belirgin bir artış olduğu görülmüştür (Kamoun 2004). Bunlara ek olarak, H₂S mitokondride reaktif oksijen türevlerini (ROS) süpüren bir antioksidan olan glutatyonun üretimini arttırmakta ve nöroprotektan görevi yapmaktadır (Kimura, 2013). Ayrıca, santral sinir sisteminde yer alan nöronları glutamat ile indüklenen oksidatif strese ve oksitozise karşı korumaktadır. Bunun nedeninin H₂S'in, γ -glutamil sistein sentetaz ve sistein transportunun sürekli devamını sağlaması ve böylelikle glutatyon seviyesinin artmasına bağlı olarak ortaya çıkan pleiotropik etkiler olduğu ileri sürülmektedir (Kimura ve Kimura 2004).

Kalsiyum, normal koşullarda hücre sel fonksiyonların düzenlenmesi için esansiyel olan bir elementtir. Hücre içi kalsiyum [Ca⁺⁺]_i konsantrasyonunun artması veya azalmasının sonucu olarak membran iyon kanallarının aktivitesinin düzenlenmesi beyinde nöronların uyarılmasına yol açmaktadır. Kalsiyum aynı zamanda mikroglia hücreleri gibi eksite olmayan, aksiyon potansiyeli üretmeyen veya iletmeyen hücrelerde de kritik bir rol oynamaktadır. H₂S'in santral sinir sisteminde sentezlenmesine etki eden faktörleri araştırmak için yapılan bir in vitro çalışmada ise, CBS enziminin Ca⁺⁺ ve kalmodulin varlığında, yokluğuna kıyasla 3,5 kat daha hızlı bir şekilde H₂S üretimine neden olduğu gösterilmiştir (Kamoun 2004). Yapılan bir başka çalışmada da, H₂S'in hem nöronal hem de glial hücrelerde sAMP/sAMP bağımlı protein kinaz A yolağını aktive ettiği ileri sürülmüştür (Kimura 2000). Sıçan mikroglialarının primer kültürlerinde yapılan bir çalışmada, H₂S'in [Ca⁺⁺]_i yükselmesini hem plazma membranı

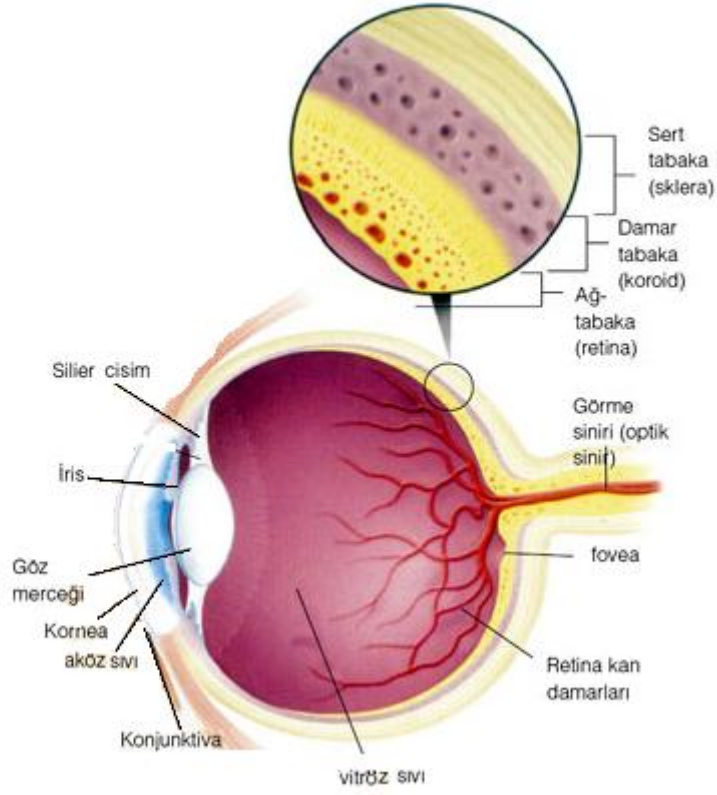
yolu ile Ca^{++} influksunu hem de hücre içi depodan Ca^{++} salımını sAMP/PKA yolağı ile indüklediğı bildirilmiştir (Lee ve ark. 2007).

2.1.4. Hidrojen Sülfür'ün Göz Üzerine Etkileri

2.1.4.1. Göz Anatomisi

Göz, başın sağ ve sol tarafında yer alan iki göz çukuruna yerleşmiş herbiri yaklaşık 2,5 cm çapında ve $6,5 \text{ mm}^3$ hacminde, dış dünya ile görsel iletişimi sağlayan küre şeklinde organdır.

Göz temel olarak iki kompartmandan oluşmaktadır. Gözün ön bölümünde lens ile kornea arasında aköz hümör ile iris, göz bebeğı (pupil), silier cisimcikler, sirküler ve sifinkter kaslar, trabeküler ağ ve schlem kanalı gibi sıvılar ve dokular bulunmaktadır. Gözün arka bölümünde ise içi viskoz jel kıvamında vitröz hümör ile içten dışa doğru; sensoryal retina tabakası, vasküler koroida tabakası ve gözün dış kısmını kaplayan ve bütünlüğünü sağlayan fibröz tabaka bulunmaktadır. Fibröz tabaka (tunica fibrosa); sklera ve korneadan oluşur ve göz küresinin şeklinin korunmasını sağlar. Vasküler tabaka (tunica vasculosa); koroid, korpus siliyare ve iristen oluşur ve kan damarları ve pigment açısından zengin bir tabakadır. Sensorial tabaka (tunica sensoria) ise retinal veya sinirsel tabaka olarak da adlandırılmaktadır (Yıldırım 2002).



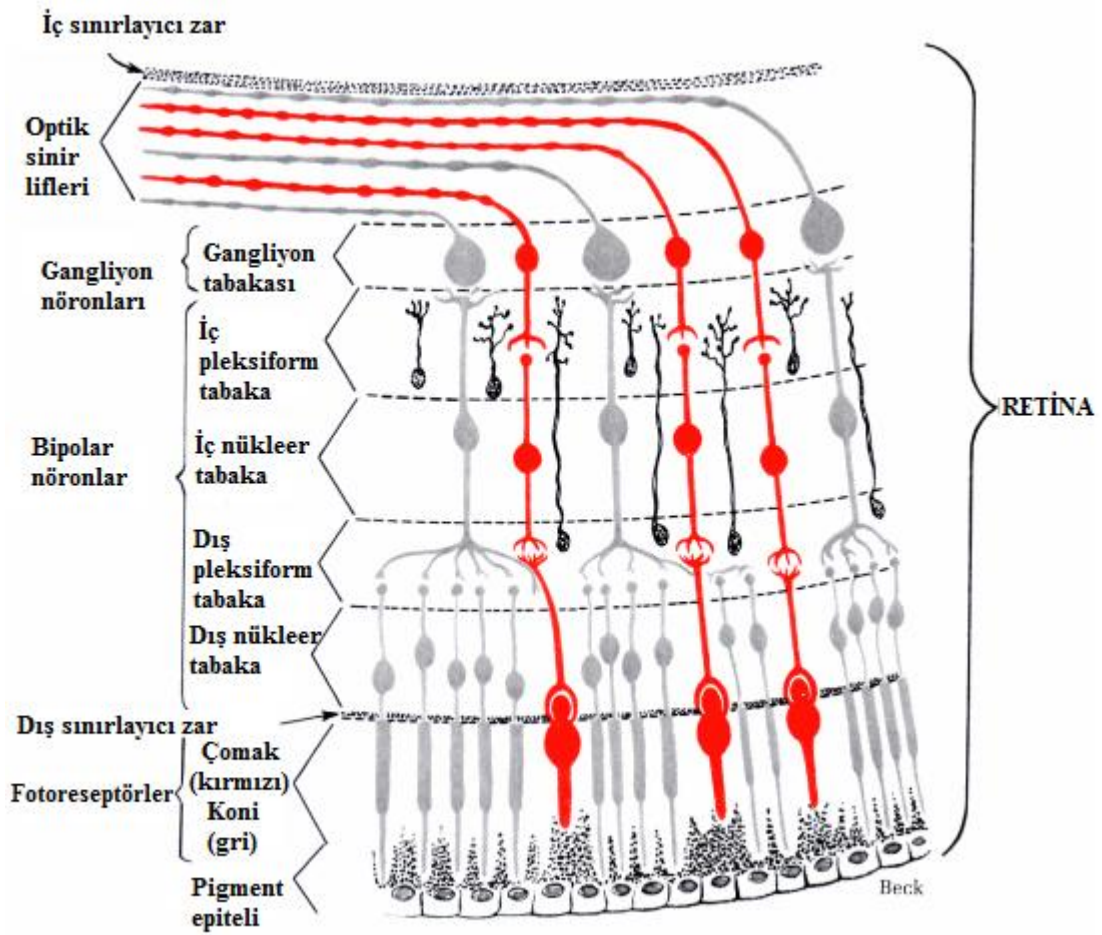
Şekil 2-1: Gözün anatomisi.

2.1.4.2. Gözün Retina Tabakası

Retina göz küresinin arka bölümünde perifere doğru incelen optik sinire doğru kalınlaşan çeşitli hücre katmanlarından ve birçok reseptörden oluşan yaklaşık 0,5 mm kalınlığında olan bir tabakadır. Retinanın merkezini, görmede keskinliği sağlayan bölge olan fovea oluşturur. Foveanın aşağıya doğru biraz uzağında beyaz görünümlü, yuvarlak şekilli, merkezinde optik sinirler ve ana retinal kan damarlarının bulunduğu bir bölge yer alır ve bu bölge kör nokta olarak tanımlanır. Kör nokta optik sinirinin (nervus opticus) gözü terk ettiği bölgedir. Optik sinir, ganglion hücrelerinin aksonlarını içerir ve beyine kadar ulaşır (Yıldırım 2002).

Retinanın dik olarak bir kesiti alındığında dıştan içe doğru sırasıyla şu katmanlardan oluştuğu görülür; (Guyton ve Hall 2001)

- Pigment tabakası,
- Koni ve basillerin pigment içine uzayan tabakası,
- Dış sınırlayıcı zar,
- Koni ve basillerin hücre gövdelerini içeren dış nükleer tabaka,
- Dış pleksiform tabaka,
- İç nükleer tabaka,
- İç pleksiform tabaka,
- Gangliyon tabakası,
- Optik sinir lifleri tabakası,
- İç sınırlayıcı zar.



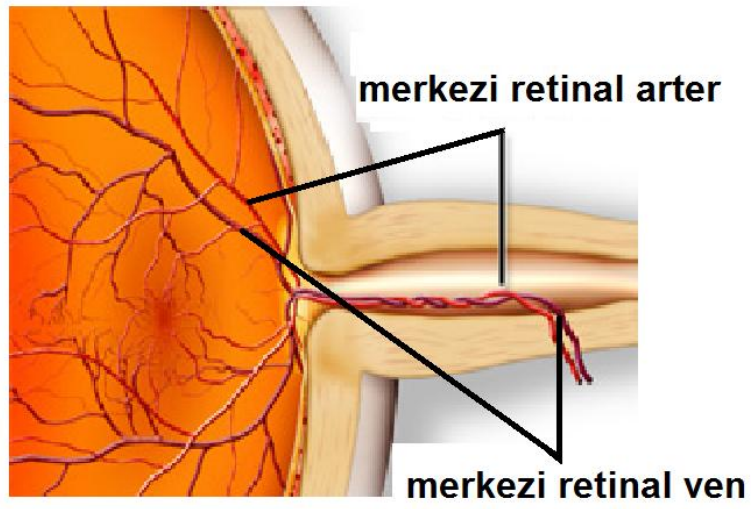
Şekil 2-2: Retinanın hücre katmanlarının görüntüsü.

2.1.4.3. Retinanın Kanlanması

Retinanın kanlanması (mikrosirkülasyonu), retinada bulunan çok sayıda reseptör ve sinir hücrelerinin fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için gerekli olan oksijen ihtiyacının karşılanması açısından çok önemlidir (Delaey ve Van de Voorde 2000). Retinanın oksijen ihtiyacı genel olarak koroidal ve retinal sirkülasyon aracılığıyla karşılanmaktadır. Bu iki dolaşım, hem anatomik hem de fonksiyonel olarak farklılıklar göstermektedir. Koroidal dolaşım sempatik ve parasempatik sistem tarafından innerve edilirken, retinal dolaşımın otonomik innervasyonu bulunmamaktadır. Buna karşın optik sinirin başı ve retina boyunca α - ve β -adrenerjik reseptörleri ve anjiyotensin-II reseptörleri bulunmaktadır (Denis ve Elena 1989; Senanayake ve ark. 2007). Retinal sirkülasyonun akış hızı düşük, oksijen miktarı yüksek buna karşın koroidal sirkülasyonun akış hızı yüksek, oksijen miktarı ise düşüktür (Delaey ve Van de Voorde 2000).

Retinanın kanlanmasını sağlayan retinal damarlar, optik sinirin gözü terk ettiği bölgeden başlayarak fovea dışında tüm retina boyunca dağılım göstermektedir. Foveanın oksijen ihtiyacı ise koroidal damarlar ile karşılanmaktadır. Retinanın kanlanmasını sağlayan merkezi retinal arter, merkezi retinal ven ile paralel ilerleyerek optik sinir ile birlikte göze girmekte ve retina boyunca dallanmalar yaparak dağılım göstermektedir. Oftalmoskop ile bakıldığında retinal arter parlak kırmızı, retinal ven ise koyu kırmızı renkte görülmektedir ve venler arterlere göre daha geniştir (Lang 2001). Merkezi retinal arterin görevi retinanın iç katmanlarının kanlanmasını sağlamaktır. Retinanın dış tabakalarının çoğu damar açısından zengin olan koroid tabakası tarafından difüzyon yolu ile beslenmektedir (Lang 2001; Guyton ve Hall 2007).

Merkezi retinal arter, yapısı ve damarın büyüklüğü göz önüne alındığında “arter” olarak adlandırılabilir aslında bir “arteriyol”dür ve optik sinirle birlikte göze girdikten sonra anastomoz yapmadan dört ana dala ayrılmaktadır. Bunlar; inferior temporal, inferior makular, superior temporal ve superior makular retinal arteriyollerdir (Lang 2001; Guyton ve Hall 2007).



Şekil 2-3: Merkezi retinal arter ve venin şematik gösterimi.

2.1.4.4. Retinal Arterlerin Endotel ve Düz Kas Fonksiyonu

Damar düz kası gevşemesinde endotel tabakasından sentezlenen nitrik oksit (NO), vazodilatör prostaglandinler, endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) vb endojen gevşeticilerin rolü bulunmaktadır. Asetilkolin, histamin, bradikinin gibi birçok endojen maddenin endotel tabakasından NO serbestlenmesine neden olarak damar düz kasında gevşeme oluşturduğu; sodyum nitroprusiyat ve papaverin gibi vazodilatör ajanların ise sırayla NO açığa çıkararak ya da direkt düz kasa etki ederek gevşeme oluşturduğu bilinmektedir. Bu nedenle retinal damarların endotel fonksiyonunu veya düz kas gevşeme kapasitesini değerlendirmek amacıyla asetilkolin (Benedito ve ark. 1991b; Delaey ve Van de Voorde 1998a), histamin (Benedito ve ark. 1991a), sodyum nitroprusiyat (Benedito ve ark 1991b; Delaey ve Van de Voorde 1998a) ve papaverin (Delaey ve Van de Voorde 1998a) gibi çeşitli vazoaaktif maddeler sıklıkla kullanılmaktadır. Retinal arterlerin endotel ve düz kas gevşeme kapasitelerini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterine kümülatif asetilkolin ve sodyum nitroprusiyat uygulanmış ve her iki ajanın retinal arterlerde konsantrasyon-bağımlı orta düzeyde gevşemelere neden olduğu gösterilmiştir (Benedito ve ark. 1991b). Bir başka çalışmada, histaminin de retinal arterlerde asetilkolin ile benzer bir gevşeme yanıtı oluşturduğu bildirilmiştir (Benedito ve ark. 1991a). İzole sığır retinal arterlerinde yapılan farklı bir çalışmada ise, trombin ile prekontrakte izole retinal arterlerin asetilkolin ve sodyum nitroprusiyat ile elde edilen gevşeme cevaplarının düşük olduğu buna karşın direkt etki ile düz kasta gevşemeye neden olan papaverinin bu damarları tamamen gevşettiği gösterilmiştir (Nyborg ve Nielsen 1990b). Yapılan başka bir çalışmada da NO donörlerinin izole sığır retinal arterlerinde zayıf bir gevşemeye neden olduğu ancak papaverinin bu damarları tamamen gevşettiği, sığır retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde sGMP aracılı mekanizmaların etkisinin zayıf olduğu bildirilmiştir (Delaey ve Van de Voorde 1998a). Bir başka çalışmada, $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterine kümülatif olarak Ach ve SNP uygulanması ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları da orta derecede ve sırasıyla yaklaşık olarak %35 ve %45 civarındadır (Takır ve ark. 2011).

2.1.4.5. Retinal Arterlerin Tonüsünün Düzenlenmesi

Retinal kan akımı myojenik ve metabolik mekanizmaların, damar endotelinden ve/veya arter duvarını çevreleyen doku tarafından salınan vazoaaktif maddelerin aracılığıyla otoregüle edilmektedir. Otoregülasyon, rezistans damarların (arteriyoller, kapillerler) perfüzyon basıncındaki değişikliklere veya dokunun metabolik ihtiyaçlarına olan adaptasyon ile düzenlenmektedir. Bu uyum, arteriyoler düz kas hücreleri ve kapillerleri etkileyen çok sayıda mekanizmanın etkileşmesi ile meydana gelmektedir (Pournaras ve ark. 2008).

Retinal dolaşım; adrenerjik, kolinerjik ve peptiderjik innervasyonun bulunmadığı farklı özelliklere sahip bir dolaşım türüdür. Bu nedenle retinal kan akışının genel olarak otoregülatör mekanizmalar ve komşu hücrelerden salınan NO, prostaglandinler, endotelin-1, histamin ve adozin gibi lokal faktörler ile regüle olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, retinal kan akımının otoregülasyonunun myojenik ve metabolik mekanizmalara dayandığına inanılmaktadır. İzole retinal arterlerde perfüzyon basıncında veya transmural basınçta oluşan artışın, myojenik kasılma cevabını arttırdığı bildirilmiştir. Diğer yandan, retinal metabolitlerin konsantrasyonunda oluşan değişikliklerin de otoregülasyona katkısının olabileceği bilinmektedir (Delaey ve Van de Voorde 2000). Retinanın yapısını oluşturan hücrelerden ve retinal arterlerin endotel tabakasından vazoaaktif özellikte çok sayıda endojen madde sentezlenmektedir (Maenhaut ve ark. 2007). Bu maddelerin görevleri; retinanın hücreleri arasında iletişimin ve görme işlevinin sağlanmasına yardımcı olmak ve aynı zamanda retinal ve koroidal kan damarlarının tonüsünün düzenlenmesinde rol oynamaktır. Retinal tonüsü düzenleyen bu vazoaaktif maddeler vazokonstriktör ve vazodilatör etkili olmak üzere iki farklı gruba ayrılmaktadırlar.

Günümüzde bilindiği kadarıyla endotelin-1'in hemodinamik etkilerinden sorumlu olan ET_A , ET_{B1} ve ET_{B2} olmak üzere üç adet reseptör alt tipi karakterize edilmiştir. ET_A reseptörü damar düz kaslarında yer almaktadır ve ET-1'in belirgin vazokonstriktör etkilerinde anahtar rolü oynamaktadır. ET_{B1} reseptörü ise endotelial hücrelerde bulunmaktadır ve vazodilatasyon oluşumuna NO salımının da dahil olduğu bir süreç ile aracılık etmektedir. ET_{B2} reseptörü de damar düz kasında direkt

vazokonstriksiyon oluşumunda rol oynamaktadır (Rubanyi ve Polokoff 1994). Yapılan bir çalışmada endotel kaynaklı vazokonstriktör etkili bir madde olan endotelinin insan oftalmik arterindeki varlığı gösterilmiştir (Haefliger ve ark. 1992) Bir diğer çalışmada ise, retinal dolaşımın endotelin-1 uygulamasına konsantrasyon-bağımlı bir şekilde direkt olarak kasılma yanıtı verdiği belirtilmiştir (Bursell ve ark. 1995). İnsanlarda yapılan bir başka çalışmada da, ET-1'in güçlü bir şekilde insan retinal kan akımını etkilediği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, ekzojen ET-1'in uygulanan en yüksek konsantrasyonda retinal kan akışını yaklaşık %20 oranında azalttığı ve bu azalmanın ET_A reseptörünün selektif inhibitörü olan BQ-123 ile tamamen geriye döndüğü bildirilmiştir (Polak ve ark. 2003).

Endotelial siklooksijenaz yolağı, vazodilatör faktörlerin yanısıra fizyolojik koşullarda genel olarak serebral dolaşımda ve venlerde tromboksan A₂ (Tx_{A2}) ve PGF_{2α} gibi vazokonstriktör faktörler de üretmektedir (Haefliger ve ark. 2001). İzole sığır retinal arterlerinde yapılan çalışmalarda, arakidonik asit metabolizmasının ürünleri olan Tx_{A2} analogu olan U-46619 ve PGF_{2α}'nın kastırıcı etkileri gösterilmiştir (Nielsen ve Nyborg 1990; Delaey ve Van de Voorde 1998b).

Yapılan çalışmalarda retinal damarların otonom sinir sistemi tarafından innervasyonu olmamasına rağmen, dolaşımdaki katekolaminlerin ve serotoninin retinal arterler üzerinde vazokonstriktör etkisinin olduğu ve tonüsünün düzenlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Bir çalışmada, serotonin ve noradrenalinin izole sığır retinal arterlerinde kasılma oluşturduğu gösterilmiştir (Nielsen ve Nyborg 1990). İnsan kornea epitelyum hücrelerinde yapılan bir çalışmada serotoninin sAMP'yi inhibe ederek kasılmaya neden olduğu bildirilmiştir (Crider ve ark. 2003).

Renin-anjiyotensin sistemi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol almaktadır. Yapılan bir çalışmada, anjiyotensin II'nin izole insan posterior siliyer arterinde kasılma oluşturduğu bildirilmiştir (Nyborg ve Nielsen 1990a).

Retinal arter tonüsünün düzenlenmesinde vazokonstriktör maddeler gibi vazodilatör maddeler de rol oynamaktadır. Retinadan ve retinal arterlerin endotel tabakasından sentezlenen NO gazotransmitter olarak adlandırılmaktadır. NO düz kas

tabakasında guanilat siklazı aktive ederek sGMP düzeyinin artmasına ve retinal arterlerin gevşemesine neden olmaktadır (Haefliger ve ark. 2001). İnsanlarda yapılan bir çalışmada, sağlıklı kişilerde (nitrik oksit sentetaz) NOS inhibitörü L-NMMA'nın uygulanmasıyla sistemik kan basıncında ve bunun sonucu olarak oküler perfüzyon basıncında görülen belirgin artışa paralel olarak retinal arterlerin ve özellikle retinal venlerin çaplarının belirgin bir şekilde daraldığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda L-NMMA'nın sistemik ve retinal hemodinamik etkilerinin konsantrasyon-bağımlı şekilde ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bütün bu sonuçlar da NO'nun insanlarda retinal vasküler tonüsünün düzenlenmesinde önemli bir rolünün olduğunu göstermektedir (Dorner ve ark. 2003). Minyatür domuzların retinalarında yapılan bir çalışmada, retinada devamlı bir NO üretiminin olduğu ve NO'nun iç retina tabakasındaki arteriolar tonüsün sabit kalması için çok gerekli olduğu bildirilmiştir (Donati ve ark. 1995).

Karbonmonoksit (CO) ile indüklenen gevşeme yanıtının varlığı (Duke ve Killick 1952) altmış yılı aşan süredir bilinmesine rağmen CO'in önemi NO'nun dolaşım sistemindeki etkisinin açığa kavuşması ile tekrar gündeme gelmiştir. Sıçan kuyruk arterlerinde yapılan bir çalışmada, fenilefrin ile prekontrakte edilmiş arterlere CO uygulanması ile hızlı bir şekilde konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtı oluştuğu ve organ banyosu ortamından CO'in uzaklaştırılması ile CO ile indüklenen gevşeme cevabının tamamen ortadan kalktığı ve böylelikle CO uygulanmasından önce fenilefrin ile elde edilmiş olan izometrik kasılma seviyesinin tekrar elde edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca CO'in etki mekanizmasını aydınlatmak için sGMP inhibitörü olan Rp-8-Br-cyclicGMPS ve büyük kondüktans kalsiyum ile aktive potasyum kanalı (BK_{Ca}^{++}) inhibitörü karibdotoksin ile inkübe edilen dokularda kasılma oluşturulduktan sonra CO uygulanmıştır. Sadece Rp-8-Br-cyclicGMPS ile inkübe edilmiş dokularda CO'in düşük konsantrasyonlarında gevşeme oluştuğu fakat yüksek konsantrasyonlarında gevşeme oluşturmadığı görülmüştür. Bu durum CO'in etki mekanizmasının vasküler dokularda düşük konsantrasyonlarında sGMP'den bağımsız, yüksek konsantrasyonlarında hem sGMP bağımlı hem de sGMP bağımsız olması ile açıklanmıştır. Buna ek olarak, dokular Rp-8-Br-cyclicGMPS ve karibdotoksin ile birlikte inkübe edildiğinde, prekontrakte edilmiş dokuya CO uygulaması ile indüklenen gevşemenin tamamen ortadan kalktığı gözlenmiş ve böylece CO'nun etki mekanizmasında BK_{Ca}^{++} kanallarının da kısmen görev aldığı belirtilmiştir (Wang ve ark. 1997).

Endotel tabakasından sentezlenen bir diğerk gevşetici faktör ise prostasiklidir (Nielsen ve Nyborg 1990). Prostrasiklin, siklooksijenaz enziminin aktivasyonu ile araşidonik asitten elde edilen siklooksijenaz yolağı ürünüdür (Smyth ve ark. 2009). Prostrasiklin, damar düz kasında adenilat siklaz enzimini aktive etmek suretiyle sAMP düzeyini yükselterek gevşemeye neden olmaktadır. Bir çalışmada; normal erkek domuzlardan izole edilen damarlar halkalarında yapılan organ banyosu deneylerinde $PGF_{2\alpha}$ ile kasılan damar halkalarına artan konsantrasyonlarda kümülatif olarak prostasiklin uygulanması ile konsantrasyon-bağımlı gevşeme elde edildiğı ve bu gevşemenin dokuda endotel varlığında daha güçlü olduğı bildirilmiştir (Hardy ve ark. 1998). Domuz retinal arterinde NO ile indüklenen vazorelaksasyon oluşumunda, prostasiklinin hem sinerjistik hem de stimüle edici etkisinin olduğı belirtilmiştir (Hardy ve ark. 1998). Domuz koroner arterlerinde yapılan bir diğerk çalışmada da, organ banyosunda bulunan prekontrakte edilmiş arter halkalarına prostasiklin uygulanması sonucunda gevşeme yanıtı elde edildiğı ve bu gevşeme yanıtının endoteli sağlam olan arter halkalarında daha güçlü olduğı bildirilmiştir (Shimokawa ve ark 1988).

Araştırmalardan elde edilen sonuçlar, insan oftalmik arterinde bazal koşullarda NO salımının varlığını ve çok güçlü bir vazorelaksan etkisinin olduğunu göstermektedir. NO üretimi bradikinin, asetilkolin ve kısmen histamin ile belirgin bir şekilde stimüle olabilmektedir. NOS inhibitörü olan nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) varlığında, serotonin ile prekontrakte edilmiş olan insan oftalmik arterinde yapılan bir çalışmada; bradikinin, asetilkolin ve histamin uygulanmasıyla elde edilen gevşeme yanıtlarının inhibitör konulmadan önce elde edilen cevaplardan daha düşük olduğı gösterilmiş ve böylece bradikinin ve histaminin oluşturduğı gevşeme yanıtında NO'nun rol oynadığını bildirilmiştir (Haefliger ve ark. 1992).

Retinal arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde bu vazoaaktif maddelerin yanı sıra retinada sentezlenen gamaamino bütirik asit (GABA) (Delaey ve Van de Voorde 1998b), glutamat (Delaey ve Van de Voorde 1998b), glisin (Delaey ve Van de Voorde 1998b), adenozin (Delaey ve Van de Voorde 1998b), adrenomedullin (Okamura ve ark 1997) ve kalsitonin gen bağımlı peptit (CGPR) (Okamura ve ark 1997) gibi endojen maddelerin de rolünün olabileceğı gösterilmiştir. Bu faktörlere ek olarak, retinal damarların içinden geçen kanın parsiyel O_2 ve CO_2 basıncı ile pH'sının da retinal

arterlerin tonüsünün düzenlenmesinde etkisinin olabileceği bilinmektedir (Delaey ve Van de Voorde 2000).

Glutamat, hücrede bulunan eksitator özellikteki N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin ana uyarıcısı olan nörotransmitterdir. Reseptör glutamat ile uyarılır, nöron hücresinde iyon kanalı açılır ve hücre içine kalsiyum girişi gerçekleşir. Kalsiyum, Ca^{++} -kalmodulin bağımlı olan nöronal NOS'u aktifler ve NO üretimi gerçekleşir; böylelikle NMDA'nın uyarılması ile sadece reseptör içeren hücrelerde değil, diğer nöronlarda da bir etki oluşur. Sıçan embriyolarının olgunlaşmamış nöronlarda yapılan bir çalışmada 1mM glutamat uygulanmasının sistin-glutamat değiş-tokuş sistemini inhibe ettiği ve bunun da oksidatif stres ile indüklenen hücre ölümüne (oksitezis) neden olduğu belirlenmiştir (Kimura ve Kimura 2004).

Yaklaşık on beş yıl önce Delaey ve Van de Voorde tarafından izole sığır gözünden elde edilen retinal dokudan, retinal kan akışının düzenlenmesinde rol oynayabilecek özellikte bir gevşetici faktör sentezlendiğini bulunmuş ve buna "Retinal Gevşetici Faktör (RRF)" adını verilmiştir (Delaey ve Van de Voorde 1998b). Yapılan çalışmalarda, RRF'in sadece sığır retinasından değil; köpek (Delaey ve Van de Voorde 1998b), domuz (Delaey ve Van de Voorde 1998b), sıçan (Boussery ve ark. 2002a) ve fare (Boussery ve ark. 2002b) retinalarından da serbestlendiği gösterilmiştir. Aynı zamanda retina kaynaklı gevşetici faktörün etkisinin sadece retinal arterle sınırlı kalmadığı; sıçan mezenterik, renal arterlerini hatta damar dışı bir düz kas olan sıçan bronş düz kasını da gevşettiği bildirilmiştir (Delaey ve Van de Voorde 1998b). İzole sığır retinal arterinde RRF'in gevşetici mekanizmasının araştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda, etkisinin endotel kaynaklı olmadığı ve ayrıca yanıtın K^+_{ATP} , K^+_v , $K^+_{Ca^{++}}$ kanallarının aktivasyonu ile de bir ilişkisinin bulunmadığı ortaya konulmuştur (Delaey ve Van de Voorde 1998b, Takır ve ark. 2011). Çeşitli spazmojen ajanlar ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arteri üzerine retina konulması ile elde edilen gevşeme yanıtının bifazik olduğu görülmüştür; bu da RRF'in gevşetici etkisinde iki farklı mekanizmanın rol alıyor olabileceğini düşündürmektedir (Takır ve ark. 2011).

2.1.4.6. Hidrojen Sülfürün Göz ve Retinal Kan Akımı Üzerine Etkileri

Retinal kan akımının düzenlenmesinde rolü bulunan bütün bu faktörlere ek olarak, yaklaşık yüzyıldır toksik olarak adlandırılan H_2S 'in, gözde de bulunduğu ve sentezlendiği bildirilmiştir (Kulkarni ve ark. 2011, Mikami ve ark. 2011). Kardiyovasküler sistem ve sinir sistemi üzerindeki etkileri üzerine birçok çalışma yapılmış olan H_2S 'in gözdeki fizyolojik etkileri ve etki mekanizması ile ilgili çok daha az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada fare retinal nöronlarında CSE ve CBS enzimlerine rastlanmadığı fakat CAT ve 3-MST enzimlerinin bulunduğu ve bu enzimlerinin retinanın iç ve dış pleksiform tabakalarında, iç ve dış nükleer tabakalarda ve fotoreseptörlerin dış katmanlarında lokalize olduğu gösterilmiştir (Mikami ve ark. 2011). Aynı çalışmada, gözde 3-MST ve CAT aracılığıyla H_2S üretiminin Ca^{++} yokluğunda en yüksek değerde olduğu ve Ca^{++} varlığı ile konsantrasyon-bağımlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. Diğer taraftan başka çalışmalarda da CBS ve CSE enzimlerinin bazı oküler dokularda bulunduğu gösterilmiştir (Persa ve ark. 2006, Pong ve ark. 2007).

İzole sığır gözünde yapılan çalışmalarda çeşitli oküler dokularda bulunan H_2S miktarı araştırılmıştır. Hem CBS hem de CSE tarafından sentezlenen H_2S 'in en fazla kornea, daha sonra aköz hümör ve retinada bulunduğu belirlenirken ve değerlerin sayısal olarak korneada yaklaşık 20 nmol/mg protein, retinada ise 17 nmol/mg protein olduğu bildirilmiştir (Kulkarni ve ark. 2011). Domuz ve insan gözlerinde CBS enziminin dağılımından yola çıkarak H_2S sentezinin olduğu kısımlar araştırılmıştır. Domuz gözünde CBS proteininin en fazla kornea, konjunktiva, iris ve daha sonra retinada mevcut olduğu bildirilmiştir. İnsan gözünde de dağılım domuz gözüne benzer şekildedir; fakat CBS proteini anterior bölümünde daha fazla retinada ise kısmen daha az bulunmaktadır (Persa ve ark. 2006). İzole domuz irisine H_2S donörleri NaHS ve Na_2S uygulanmasının iriste karbakol kasılmasını NO ve K_{ATP} kanalları aracılığıyla azalttığı bildirilmiştir (Monjok ve ark. 2008). Yapılan bir başka çalışmada ise izole domuz iris siliyer cisimciklerinde H_2S donörleri NaHS ve Na_2S 'in sempatik nörotransmisyonu inhibe ettiği NaHS ve Na_2S 'in konsantrasyon-bağımlı gevşeme

yanıtları oluşturduğu ve elde edilen bu yanıtın ortamda CSE ve CBS enzimlerinin inhibitörleri varlığında azaldığı gösterilmiştir (Kulkarni ve ark. 2009).

H₂S'in etkisinde NO, K⁺_{ATP} aracılı mekanizmaların yanı sıra adenilat siklaz yolağının da rolünün olduğu bildirilmektedir. İzole sığır ve domuz retinalarında yapılan bir çalışmada, H₂S donörü NaHS ve Na₂S'in zaman ve konsantrasyon-bağımlı bir şekilde sAMP seviyesini bazal düzeyin üzerine çıkarttığı görülmüştür. sAMP seviyesindeki artışın sığır retinasında daha fazla olduğu, H₂S'in etkisinin türe göre değiştiğini ve memeli retinasında sinyal iletiminde önemli bir rolünün olabileceğini ileri sürülmüştür (Njie-Mbye ve ark. 2010).

Sinyal molekülü ve sitoprotektan özellik göstermesiyle tanınan H₂S'in nöronları oksidatif strese karşı koruduğu bilinmektedir. Retinanın fotoreseptör hücrelerinin aşırı miktarda ışığa uzun süre maruz kalması reaktif oksijen türevleri (ROS) ve influksusu, Ca⁺⁺ kanalları aracılığı ile Ca⁺⁺'un hücre içi konsantrasyonunun artması gibi çeşitli nedenlerle geri dönüşü olmayan şekilde hasar görmektedir. H₂S'in bu etkisini görmek amacıyla farelere in vivo olarak NaHS uygulanmış ve aşırı ışığa maruz bırakıldıklarında, H₂S'in ışık ile indüklenen dejenerasyona ve oksidatif strese karşı koruduğu gözlemlenmiştir. Görülen nöroprotektif etkinin mekanizmasını açığa kavuşturmak için yapılan çalışmalarda, H₂S'in fotoreseptör hücrelerine Ca⁺⁺ influksunu vakuoler tipteki H⁺-VATPaz enzimini aktive ederek düzenlediğini ve böylelikle fotoreseptör hücrelerinde Ca⁺⁺ konsantrasyonunun yükselmesini engelleyerek homeostazisi sağladığı bildirilmiştir (Mikami ve ark. 2011).

H₂S'in göz dokuları ve retinadaki etkilerinin ve etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik yapılan az sayıdaki çalışmalarda H₂S ve retinada sentezlenip serbestlenen glutamatta rolü incelenmiştir. İzole domuz ve sığır retinalarında yapılan bir çalışmada retinaların H₂S donörleri olan NaHS ve Na₂S ile inkübe edilmesinin glutamat markerı olarak [³H] D-aspartatı konsantrasyon-bağımlı olarak azalttığı ve H₂S'in gözün posteriorunda aminoasit nörotransmisyonunda fizyolojik ve farmakolojik görevlerinin olabileceği ileri sürülmüştür (Opere ve ark. 2009).

Daha önce yapılmış olan çalışmalar arasında H₂S'in gözün çeşitli dokularındaki etkilerini ve bu etkilerin mekanizmalarını inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Fakat günümüze kadar H₂S'in retinal arter tonüsün düzenlenmesi üzerine etkilerini inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızın amacı, H₂S'in izole sığır retinal arteri üzerine etkisi ve bu etkinin mekanizmasını incelemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri

Çalışmamızda kullanılan gözler, veteriner kontrolünden geçmiş Montofoner ırkı (Brown Swiss) 2-4 yaşında yetişkin erkek veya dişi sığırlardan alınmıştır. Gözler Dostlar Et ve Et Ürünleri Ticaret ve Sanayi A.Ş. firmasının günlük sığır kesimlerinden temin edilmiştir.

3.2. Araç ve Gereçler

Çalışmamızda:

- Dört kanallı telli myograf sistemi (DMT&ADInstruments; Model 610M)
- Karışım (%95 O₂+%5 CO₂) Gaz Tüpü
- Mikropipet (Eppendorf)
- Cerrahi makas ve pens
- 40 µm çapında paslanmaz çelik tel
- Doku taşıma kabı
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Petri kutusu
- Diseksiyon mikroskobu (Zeiss 2000)
- Soğuk ışık kaynağı (Schott)
- Termostatlı su banyosu (Thermomiks)
- Bilgisayar

- “ADInstruments Powerlab Chart5 for Windows” yazılım programı
- “ADInstruments Powerlab DMT Normalization v1 for Windows” yazılım programı kullanılmıştır.

3.3. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları

Sodyum hidrosülfid (NaHS): Stok çözeltisi 10^{-2} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$): Stok çözeltisi 10^{-5} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Noradrenalin (NA) : Stok çözeltisi 10^{-4} M olarak 0,001N HCl’de hazırlanmıştır. Stok çözeltisinin hazırlanması esnasında maddenin stabilizasyonunu sağlamak için 1 mg/ml oranında askorbik asit (Merck) ilave edilmiştir. Stok çözeltisi ve dilüsyonlar ışıktan korunmuştur.

KCl (K⁺): Stok çözeltisi 10^{-2} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Asetilkolin HCl (Ach): Stok çözeltisi 10^{-4} M olarak 0,001N HCl’de hazırlanmıştır.

Sodyum nitroprussiyat (SNP): Stok çözeltisi 10^{-4} M olarak distile suda hazırlanmıştır. Stok çözeltisi ve dilüsyonlar ışıktan korunmuştur.

N^G-nitro-L-Arginin (L-NOARG): Stok çözeltisi 10^{-4} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3-a]Quinoxalin-1-One (ODQ): Stok çözeltisi 10^{-5} M olarak DMSO’da hazırlanmıştır.

İndometazin: Stok çözeltisi 10^{-5} M %5 NaHCO₃ (w/v) çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır.

Glibenklamid: Stok çözeltisi 10^{-5} M olarak DMSO’da hazırlanmıştır.

Apamin: Stok çözeltisi 10^{-7} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Nifedipin: Stok çözeltisi 10^{-6} M olarak DMSO’da hazırlanmıştır.

SQ 22536: Stok çözeltisi 10^{-5} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

Baryum klorür (BaCl₂): Stok çözeltisi 10^{-2} M olarak distile suda hazırlanmıştır.

4-aminopiridin (4-AP): Stok çözeltisi 2×10^{-3} M olarak DMSO'da hazırlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan solüsyonlar derin dondurucuda -20 °C'de saklanan stoktan her deney gününde Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisi ile dilüe edilerek taze olarak hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılan Krebs Ringer-bikarbonat çözeltisindeki kimyasal içeriği mM cinsinden şu şekildedir: [NaCl: 135; KCl: 5; NaHCO₃: 20; Glukoz: 10; CaCl₂: 2,5; MgSO₄.7H₂O:1,3; KH₂PO₄: 1,2; EDTA: 0,026].

Deneylerde kullanılan bazı kimyasalların hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan DMSO, NaHCO₃ ve HCl'nin deney ortamındaki konsantrasyonları %0,1'den düşüktür ve izole sığır retinal arterleri üzerine direkt bir etkileri bulunmamaktadır.

3.4. İzole Sığır Retinal Arterlerinin Hazırlanması

Yeni kesilmiş sığırlardan alınan gözler mezbahadan laboratuvarımıza özel taşıma kabında ve kısmen buzlu Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu içerisinde hızlı bir şekilde getirilmiştir. Gözler laboratuvar ortamında da taşıma kutusunda ve Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu içerisinde muhafaza edilmiştir.

Deneyde kullanılacak gözler, laboratuvarda bir petri kutusuna alındıktan sonra ekstra oküler kaslardan ve çevere dokulandan bir makas yardımı ile temizlenmiştir. Daha sonra gözler, korneal bölgenin yaklaşık 0,5 cm gerisinden kesilerek ikiye ayrılmıştır. Gözün vitröz hümör ile dolu olan kısmı bir petri kutusuna alınmıştır. Vitröz humor dikkatli bir şekilde dışarıya akıtılmış ve göz küresinin içi Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu ile doldurulmuştur. Bu işlemler esnasında retinanın ve retinal damarlarının zarar görmemesine özen gösterilmiştir. Ardından diseksiyon mikroskobu altında, gözün retina tabakasının üzerinde bulunan merkezi retinal arterden myograf sistemindeki doku tutucuları arasına girecek uzunlukta damar parçaları kesilerek myograf sistemine alınmıştır. Damarların içerisinden her biri 40 µm çapında olan iki paslanmaz çelik tel geçirilmiş ve bu tellerin biri myografin transduserine diğeri de

mikrometreye sabitlenmiştir. Myograf sistemine yerleştirilen retinal arterin çevresinde bulunan retina ve retinal ven parçası pens ve göz makası yardımı ile dikkatlice temizlenmiştir.

3.5. Yöntem

3.5.1. Retinal Arterlerin Standardizasyonu ve Endotel ve Düz Kas Gevşeme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Damarlar Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu içeren ve % 95 O₂ + % 5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılan myograf sistemine yerleştirilmiştir. Bir saat süre ile 37°C'de dengelenmeye bırakılan damarların içinde buldukları Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu her 10-15 dakikada bir değiştirilmiştir. Dengelenme süresinin ardından normalizasyon işlemi uygulanmıştır. Normalizasyon işleminde, damarlara uygulanan gerim mikrometre ile kademeli olarak arttırılmış (her basamakta 2 mN/mm) ve pasif damar duvar geriminin iç çevre ile ilişkisi çalışılmıştır. Böylece normal fizyolojik koşullarda, tamamen gevşemiş damarın içinden geçen kanın damar duvarına yaptığı basınca (transmural basınç; 13,3 kPa [100 mmHg]), karşılık gelen iç çevre (IC₁₀₀) belirlenmiş ve retinal arterlerin gerimi bir mikrometre yardımıyla bu iç çevrenin %90'ına (IC_i=0,9xIC₁₀₀) karşılık gelen düzeye getirilmiştir.

Retinal arterler normalizasyon işlemi sonucunda belirlenmiş olan ön gerimde 30 dakika süreyle tekrar dengelenmeye bırakılmıştır. Sonrasında, standardizasyon işlemi için dokular 20 dakika ara ile iki defa potasyum klorür (K⁺; 100 mM) ve noradrenalin (NA; 10⁻⁴ M) kombinasyonu ile kastırılmıştır. Standardizasyon işleminden sonra endotel tabakasının kontrolü için damarlar PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış ve üzerine endotel aracılı gevşeme oluşturan asetilkolin (Ach; 10⁻⁸-10⁻⁴ M) verilerek konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtı elde edilmiştir. Düz tabakasının kontrolü için de damarların sodyum nitroprussiyat (SNP; 10⁻⁸-10⁻⁴ M) ile elde edilen gevşeme yanıtları incelenmiştir.

3.5.2. Sığır Retinal Arterinde Hidrojen Sülfür'ün Etkisinin İncelenmesi

H₂S'in etkisi solüsyona verildiğinde yıkılarak H₂S açığa çıkaran donörü NaHS ile incelenmiştir. Damarlar spazmojen ajanlar olan PGF_{2α} (3x10⁻⁵ M) veya K⁺ (100 mM) ile prekontrakte edildikten sonra NaHS artan konsantrasyonlarda kümülatif olarak (10⁻⁶-3x10⁻³ M) uygulanmıştır.

3.5.3. Sığır Retinal Arterinde Hidrojen Sülfür'ün Etki Mekanizmasının İncelenmesi

Retinal arterlerde NaHS'in etkisinin incelenmesinin ardından etki mekanizmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla PGF_{2α} (3x10⁻⁵ M) ile prekontrakte edilen retinal arterlerde, NaHS'in etkisi NO sentezine aracılık eden NOS enziminin spesifik inhibitörü L-NOARG (10⁻⁴ M; 20 dk), guanilat siklaz enziminin spesifik inhibitörü ODQ (10⁻⁵ M; 20 dk) veya siklooksijenaz enziminin spesifik inhibitörü indometazin (10⁻⁵ M; 20 dk) varlığında ya da endotel tabakası mekanik olarak bir saç teli ile tahrip edilmiş damarlarda araştırılmıştır.

K⁺ kanallarının açılmasının damar düz kasının hiperpolarizasyonuna neden olarak gevşeme oluşturduğu bilinmektedir. H₂S'in etkisinde endotelial vazodilatatör faktörlerin etkisinin incelenmesinin ardından potasyum kanallarının rolü incelenmiştir. Bu amaçla PGF_{2α} (3x10⁻⁵ M) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterlerinde NaHS'in etkisi ATP duyarlı potasyum kanalı (K_{ATP}) inhibitörü glibenklamid (10⁻⁵ M; 20dk.), küçük kondüktans kalsiyum ile aktive potasyum kanalı (SK_{Ca⁺⁺}) inhibitörü apamin (3x10⁻⁷ M; 20 dk.), voltaj bağımlı potasyum kanalı (K_v) inhibitörü 4-aminopiridin (2x10⁻³ M, 20 dk) veya içe akım potasyum kanalı (K_{ir}) inhibitörü BaCl₂ (10⁻² M; 20 dk) varlığında test edilmiştir.

Düz kasın tonüsünün belirlenmesinde Ca⁺⁺'un hücre içindeki konsantrasyon düzeyi önemlidir. Çalışmamızda H₂S'in etkisinde L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum

kanallarının kapatılması sonucu damar düz kası hücre içine kalsiyum girişinin engellenmesinin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterlerinde NaHS'in etkisi L-tipi voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarının spesifik inhibitörü nifedipin (10^{-5} M; 20 dk) varlığında incelenmiştir.

Adenilat siklaz; birçok hormon, nörotransmitter ve endojen vazoaaktif maddenin hücrel yanıtına aracılık eden bir enzim olup hücre içinde ikincil ulak olarak sAMP düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır. Hücre içinde yükselen sAMP düzeylerinin proteinkinazlar aracılığı ile hücre içi Ca^{++} düzeylerinde azalmaya neden olarak gevşemeye yol açtığı bilinmektedir. Çalışmamızda H₂S'in sığır retinal arterindeki etkilerinde adenilat siklaz-sAMP yolağının rolünün incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilmiş izole sığır retinal arterlerinde NaHS'in etkisi adenilat siklaz inhibitörü SQ 22536 (10^{-5} M; 20 dk) varlığında incelenmiştir.

H₂S'in izole sığır retinal arterleri üzerindeki doğrudan etkilerinin ve görülen etkinin mekanizmasının incelenmesinin ardından H₂S'in damarların spazmojen ajanlara karşı reaktiviteleri üzerinde preventif etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla izole sığır retinal arterlerinde $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-8} - 10^{-4} M) veya K^+ (10 mM-100 mM) ile elde edilen konsantrasyon-bağımlı kasılma yanıtları H₂S donörü NaHS ile (3×10^{-3} M; 20 dk) inkübe edilmiş damarlarda incelenmiştir. Elde edilen yanıtlar inkübasyon yapılmadan önce alınan kastırıcı yanıtlar ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda, inhibitörlerin etkisi aynı retinal arter segmentlerinin paralel parçalarında çalışılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Veriler “ortalama±standart hata” şeklinde gösterilmiştir. Deney gruplarında belirtilen “n” sayısı çalışılan sığır retinal arterlerinin sayısını göstermektedir. Kastırıcı ajanların kasılma yanıtları “mN/mm”, prekontrakte edilen dokularda NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları prekontraksiyona göre “%” cinsinden verilmiştir. E_{maks} ; deneylerde kullanılan çeşitli vazoaaktif ajanların maksimum konsantrasyonlarının uygulanması ile elde edilen kasılma veya gevşeme yanıtını, pEC_{50} ; maksimum konsantrasyonun uygulanması ile elde edilen yanıtın (kasılma veya gevşeme) %50’sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değerini göstermektedir. İstatistiksel analizde “Student’s t test” (iki eş arasındaki farkın anlamlılık testi ve gruplar arası farkın anlamlılık testi) ve “ANOVA” (tek yönlü varyans analizi) kullanılmış ve “p” değeri 0,05’ten küçük olan karşılaştırmalar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.1. İzole Sığır Retinal Arterlerinin Endotel ve Düz Kas Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

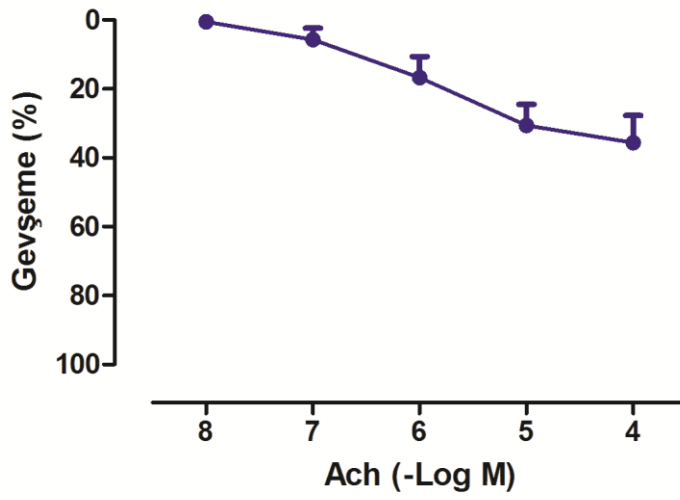
4.1.2. Asetilkolinin Etkisi

İzole sıçan mezenterik arterlerinin endotel fonksiyonunun belirlenmesi amacıyla $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilen arterlere kümülatif olarak Ach (10^{-8} – 10^{-4} M) uygulanması konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtlarına neden olmuştur ($E_{\text{maks}} = \%35,71 \pm 1,53$ n=8; Şekil 4-1A).

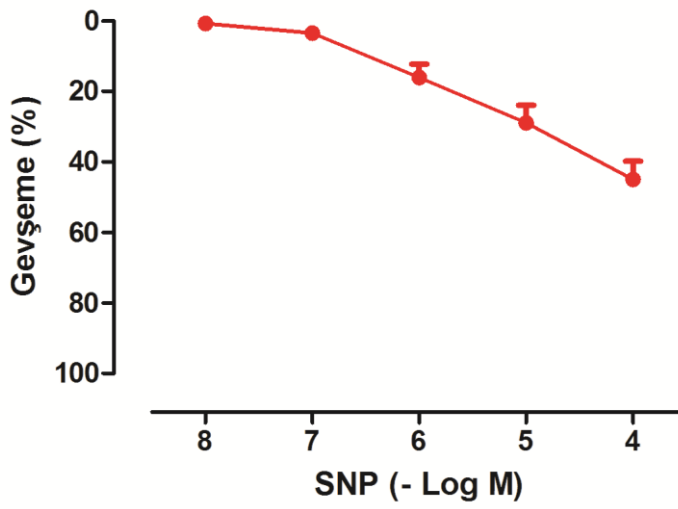
4.1.3. Sodyum Nitroprusiyatın Etkisi

İzole sıçan mezenterik arterlerinin düz kas gevşeme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilen arterlere kümülatif olarak SNP (10^{-8} – 10^{-4} M) uygulanması konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtlarına neden olmuştur ($E_{\text{maks}} = \%45,37 \pm 0,74\%$ n=7; Şekil 4-1B).

A)



B)



Şekil 4-1: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak A) asetilkolin (Ach; 10⁻⁸-10⁻⁴ M) ve B) sodyum nitroprusiyat (SNP; 10⁻⁸-10⁻⁴ M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.

4.2. Hidrojen Sülfür'ün Etkisinin İncelenmesi

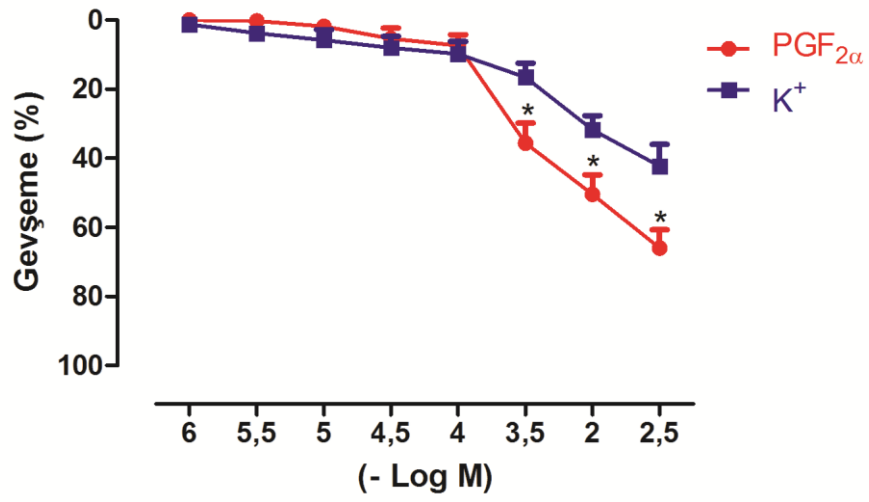
4.2.1. $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile Prekontrakte Edilmiş Retinal Arterleri Üzerine NaHS'in (10^{-6} - 3×10^{-3} M) Etkisi

İzole sığır retinal arterlerinde endotel ve düz kas fonksiyonlarının belirlenmesinin ardından H_2S 'in etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla H_2S donörü olarak NaHS kullanılmış ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile kastırılmış izole sığır retinal arter preparatları üzerine NaHS'in (10^{-6} - 3×10^{-3} M) kümülatif olarak uygulanması damarlarda konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtlarına neden olmuştur ($E_{\text{maks}} = \%66,09 \pm 5,29$; $\text{pEC}_{50} = 3,47 \pm 0,11$; $n=15$; Şekil 4-2).

Deneylerimizde paralel olarak aynı izole sığır retinal arterinin farklı iki segmentinde spazmojen ajan $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile prekontrakte edilmiş dokulara kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - 3×10^{-3} M) uygulanmış ve konsantrasyon-bağımlı gevşeme cevapları elde edilmiştir. Elde edilen maksimum gevşeme yanıtları benzerlik göstermektedir ($E_{\text{maks1}} = 53,72 \pm 5,32$ mN/mm; $E_{\text{maks2}} = 55,69 \pm 8,45$ mN/mm; $n=8$ $p > 0,05$).

4.2.2. K^+ (100 mM) ile Prekontrakte Edilmiş Retinal Arterleri Üzerine NaHS'in (10^{-6} - 3×10^{-3} M) Etkisi

$\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile kastırılmış izole sığır retinal arter preparatları üzerine NaHS'in etkilerinin incelenmesinin ardından K^+ (100 mM) ile kastırılmış damarlarda NaHS'in etkisi araştırılmıştır. Prekontrakte edilen izole sığır retinal arter preparatları üzerine NaHS'in (10^{-6} - 3×10^{-3} M) kümülatif olarak uygulanması damarlarda konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtlarına neden olmuştur ($E_{\text{maks}} = \%42,35 \pm 6,27$; $\text{pEC}_{50} = 3,34 \pm 0,05$; $n=9$ Şekil 4-2).



Şekil 4-2: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ve K⁺ (100mM) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterleri üzerine kümülatif olarak NaHS (10⁻⁶-3x10⁻³M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri.

*p<0.05 istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.3. NaHS'in Retinal Arteri Gevşetici Etkisinin Mekanizmasının İncelenmesi

4.3.1. Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktörlerin Etkisi

H₂S'in izole sığır retinal arterleri üzerine etkilerinin incelenmesinin ardından görülen etkiye endotel vazodilatatör faktörlerin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla H₂S'in donörü NaHS'in etkisi siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10⁻⁵M, 20 dk), NOS inhibitörü L-NOARG (10⁻⁴M, 20 dk), guanilat siklaz inhibitörü ODQ (10⁻⁵M, 20 dk) ile inkübe edilmiş veya endotel tabakası mekanik olarak tahrip edilmiş retinal arterlerde incelenmiştir.

4.3.1.1. Siklooksijenaz İnhibitörü İndometazinin Etkisi

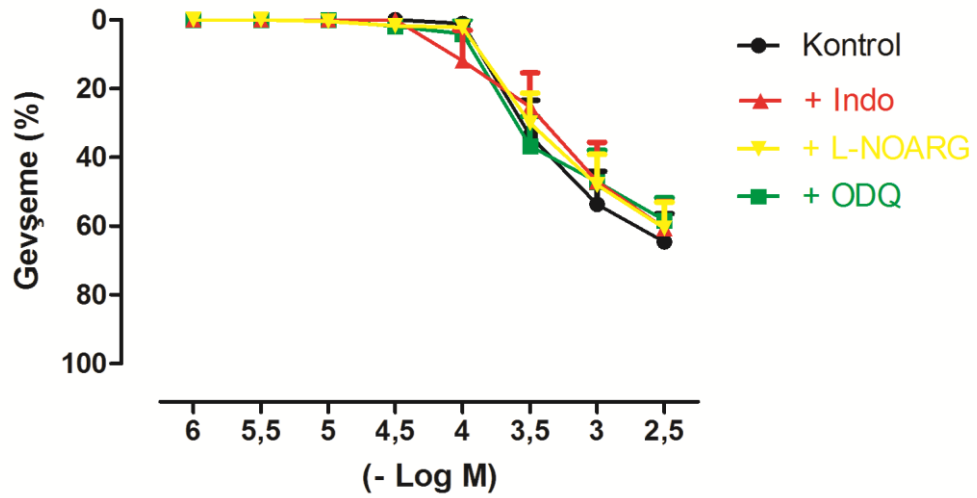
PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10⁻⁵M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10⁻⁶-3x10⁻³ M) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Kontrol E_{maks}=%64,65±8,17; +İndometazin E_{maks}=%60,66±7,61 n=10; p>0,05; Şekil 4-3 ve Tablo 4-1).

4.3.1.2. Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörü L-NOARG'ın Etkisi

PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin NOS inhibitörü L-NOARG (10⁻⁴M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10⁻⁶-3x10⁻³ M) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Kontrol E_{maks}=%64,65±8,17; +L-NOARG E_{maks}=%60,73±7,62 n=10; p>0,05; Şekil 4-3 ve Tablo 4-1).

4.3.1.3. Guanilat Siklaz İnhibitörü ODQ'nun Etkisi

PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin guanilat siklaz inhibitörü ODQ (10⁻⁵M, 20dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10⁻⁶-3x10⁻³ M) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Kontrol E_{maks}=%64,65±8,17; +ODQ E_{maks}=%58,36±6,51 n=10; p>0,05; Şekil 4-3 ve Tablo 4-1).

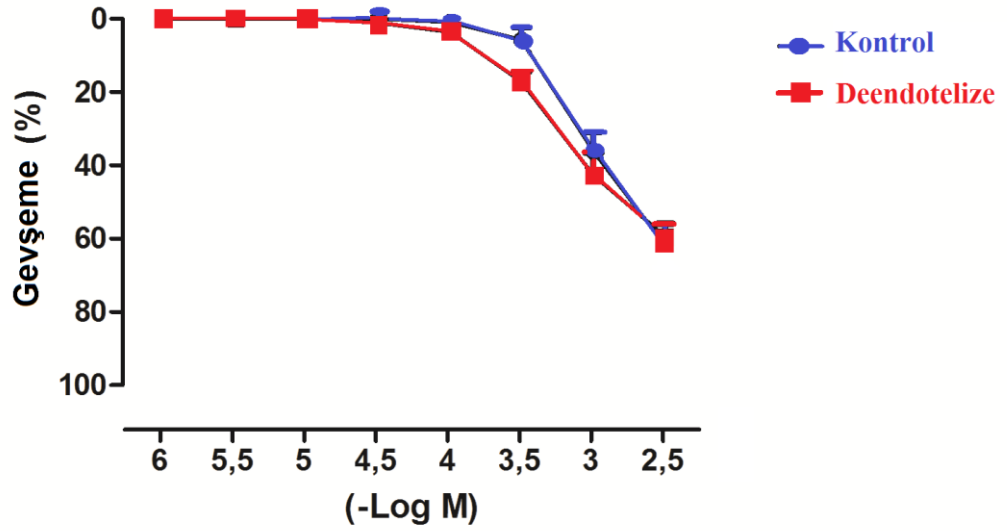


Şekil 4-3: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} \text{M}$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5}M , 20 dk), nitrik oksit sentetaz inhibitörü L-NOARG (10^{-4}M , 20 dk), guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun (10^{-5}M , 20 dk) etkisi.

$p > 0.05$.

4.3.1.4. Endotel Tabakasının Mekanik Olarak Tahrip Edilmesinin Etkisi

PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin endotel tabakasının mekanik olarak tahrip edilmesi edilmesi, NaHS'in (10⁻⁶-3x10⁻³M) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe neden olmamıştır (Kontrol E_{maks}=%61,90±5,94; Deendotelize E_{maks}=%59,45±3,37 n=7; p>0,05; Şekil 4-4 ve Tablo 4-1).



Şekil 4-4: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10⁻⁶-3x10⁻³M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine damarların endotel tabakasının mekanik olarak tahrip edilmesinin etkisi.

p>0.05.

Tablo 4-1: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10⁻⁶-3x10⁻³M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10⁻⁵M, 20 dk), nitrik oksit sentetaz inhibitörü L-NOARG (10⁻⁴M, 20 dk), guanilat siklaz inhibitörü ODQ'nun (10⁻⁵ M, 20 dk) veya damarların endotel tabakasının mekanik olarak tahrip edilmesinin etkisi.

	Prekontraksiyon düzeyi (mN/mm)	E _{maks} (%)	n
Kontrol	1,76±0,14	64,65±8,17	10
+İndometazin	1,91±0,21	60,66±7,61	10
+L-NOARG	1,85±0,17	60,73±7,62	10
+ODQ	1,65±0,17	58,36±6,51	10
Kontrol	1,67±0,15	57,30±9,40	6
Deendotelize	1,83±0,22	59,45±3,37	6

p>0,05.

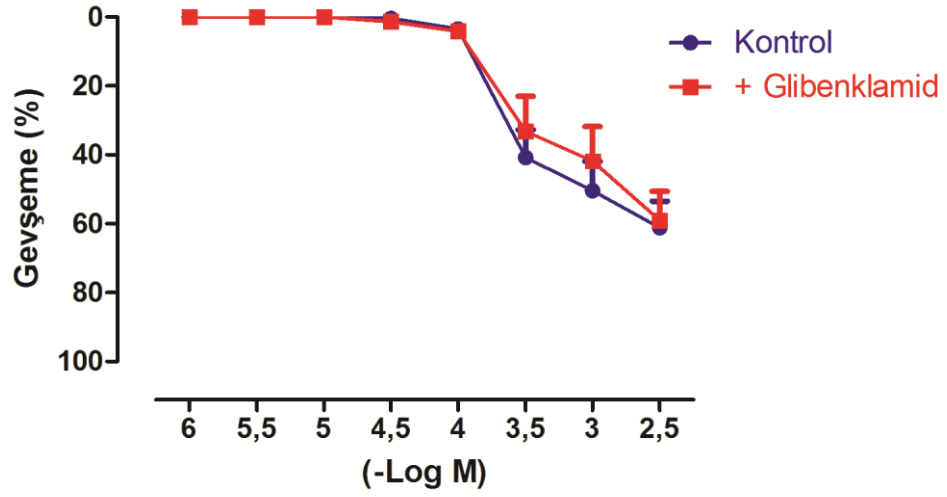
n: retinal arter sayısı

4.3.2. Potasyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi

H₂S'in izole sığır retinal arterleri üzerine etkisinin endotelyal vazodilatatör faktörler ile ilişkisinin incelenmesinin ardından görülen gevşetici etkide K⁺ kanallarının rolü araştırılmıştır. Bu amaçla H₂S'in donörü NaHS'in etkisi ATP duyarlı potasyum kanalı (K_{ATP}) inhibitörü glibenklamid (10⁻⁵M, 20 dk), küçük kondüktans kalsiyum ile aktive potasyum kanalı (SK_{Ca⁺⁺}) apamin (3x10⁻⁷ M, 20 dk), voltaj bağımlı potasyum kanal inhibitörü (K_v) 4-aminopiridin (2x10⁻³ M, 20 dk), içe akım potasyum kanal inhibitörü (K_{ir}) BaCl₂ (10⁻²M, 20 dk) ile inkübe edilmiş retinal arterlerde incelenmiştir.

4.3.2.1. K_{ATP} Kanalı İnhibitörü Glibenklamidin Etkisi

PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin K_{ATP} kanalı inhibitörü glibenklamid (10⁻⁵ M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10⁻⁶-3x10⁻³M) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe neden olmamıştır (Kontrol E_{maks}=%56,01±8,47; +Glibenklamid E_{maks}=%54,88±9,82 n=9; p>0,05; Şekil 4-5 ve Tablo 4-2).

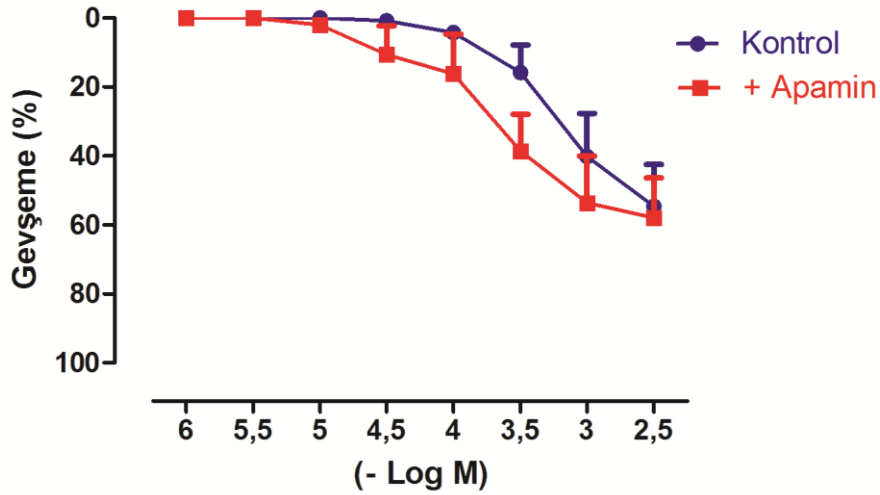


Şekil 4-5: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} \text{M}$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine K_{ATP} inhibitörü glibenklamidin (10^{-5}M , 20 dk) etkisi.

$p > 0.05$.

4.3.2.2. SK_{Ca}⁺⁺ Kanalı İnhibitörü Apaminin Etkisi

PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin SK_{Ca}⁺⁺ inhibitörü apamin (3x10⁻⁷M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10⁻⁶-3x10⁻³M) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe neden olmamıştır (Kontrol E_{maks}=%54,71±12,15; +Apamin E_{maks}=%58,02±11,60 n=7; p>0,05; Şekil 4-6 ve Tablo 4-2).

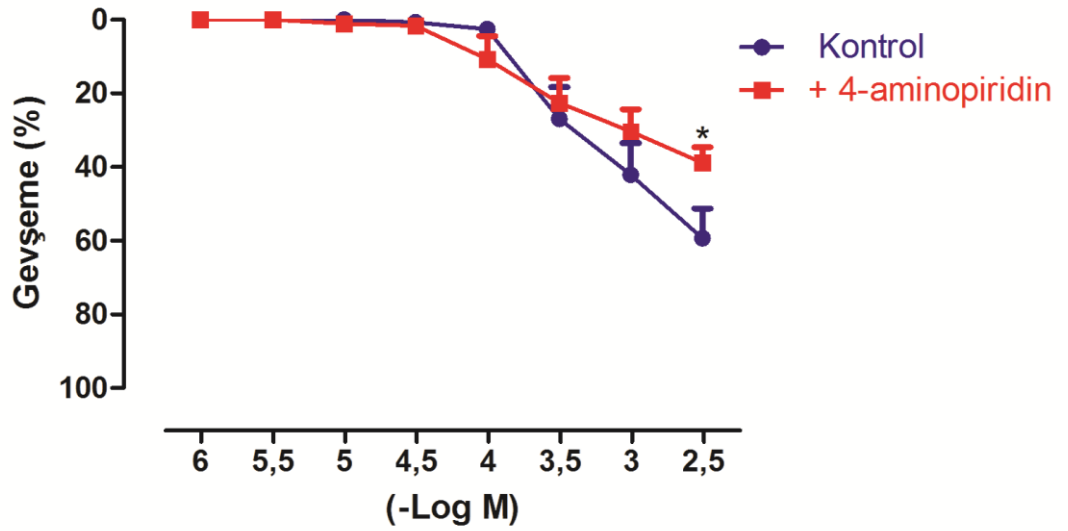


Şekil 4-6: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10⁻⁶-3x10⁻³M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine SK_{Ca}⁺⁺ inhibitörü apaminin (3x10⁻⁷M, 20 dk) etkisi

p>0.05.

4.3.2.3. K_v İnhibitörü 4-aminopiridin'in Etkisi

$PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} M$) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin K_v inhibitörü 4-aminopiridin ($2 \times 10^{-3} M$, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} M$) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur (Kontrol $E_{maks} = \%59,44 \pm 8,13$; +4-aminopiridin $E_{maks} = \%38,98 \pm 4,32$ $n=8$; $p < 0,05$; Şekil 4-7 ve Tablo 4-2).

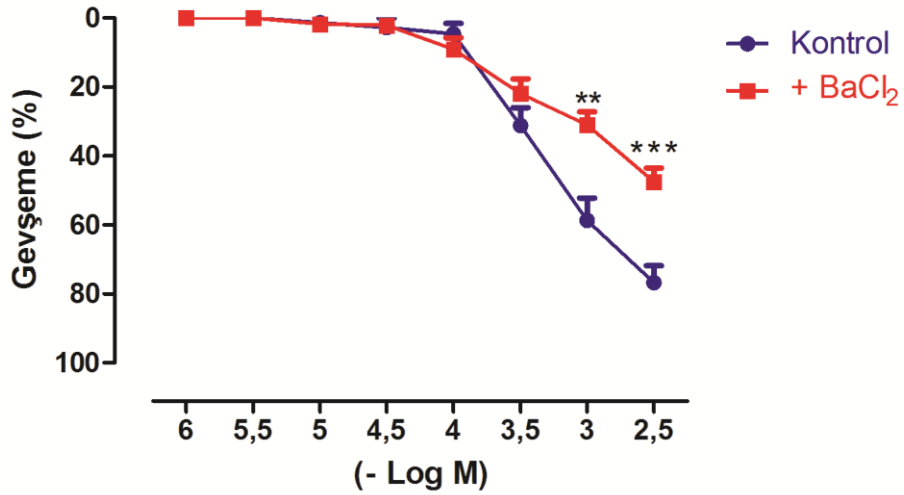


Şekil 4-7: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine K_v inhibitörü 4-aminopiridin ($2 \times 10^{-3} M$, 20 dk) etkisi.

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

4.3.2.4. K_{ir} İnhibitörü $BaCl_2$ Etkisi

$PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} M$) ile kastrılmış izole sığır retinal arterlerinin K_{ir} inhibitörü $BaCl_2$ ($10^{-2} M$, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} M$) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur (Kontrol $E_{maks} = \%76,83 \pm 4,92$; + $BaCl_2$ $E_{maks} = \%47,59 \pm 4,05$ n=11; $p < 0,001$; Şekil 4-8 ve Tablo 4-2).



Şekil 4-8: $PGF_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} M$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} M$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine K_{ir} inhibitörü $BaCl_2$ 'nin ($10^{-2} M$, 20 dk) etkisi.

** $p < 0,01$

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

Tablo 4-2: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10⁻⁶-3x10⁻³M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine K_{ATP} inhibitörü glibenklamidin (10⁻⁵ M, 20 dk), SK_{Ca⁺⁺} inhibitörü apaminin (3x10⁻⁷ M, 20 dk), K_v inhibitörü 4-aminopiridin (2x10⁻³M, 20 dk) ve K_{ir} inhibitörü BaCl₂'nin (10⁻²M, 20 dk) etkisi

	Prekontraksiyon düzeyi (mN/mm)	E _{maks} (%)	n
Kontrol	1,82±0,07	56,01±8,47	9
+Glibenklamid	1,66±0,13	54,88±9,82	9
Kontrol	1,84±0,07	54,71±7,15	7
+Apamin	1,73±0,16	58,02±8,60	7
Kontrol	1,76±0,06	59,44±8,13	8
+4-aminopiridin	1,76±0,11	38,98±4,32*	8
Kontrol	1,68±0,06	76,83±4,92	11
+BaCl₂	1,67±0,09	47,59±4,05***	11

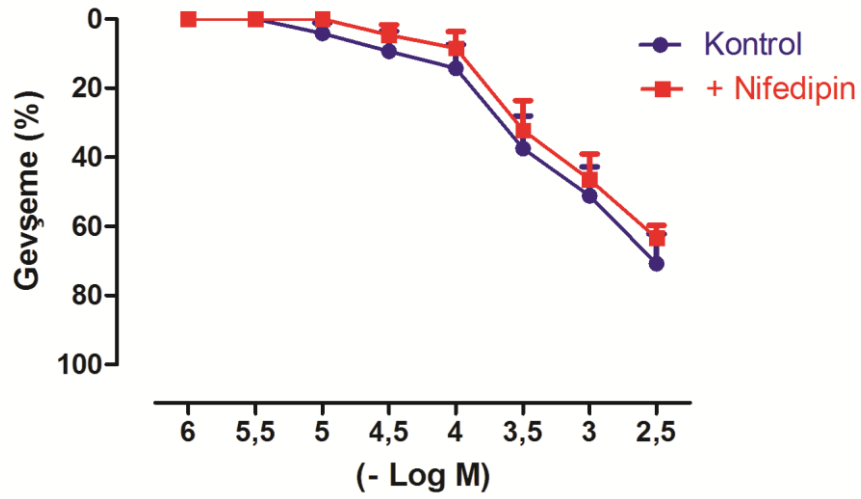
*p<0,05

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

n: retinal arter sayısı

4.3.3. L- Tipi Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi

H₂S'in izole sığır retinal arterleri üzerine etkisinin endotelial vazodilatatör faktörlerin ve K⁺ kanalları ile ilişkisinin incelenmesinin ardından görülen gevşetici etkide L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalının rolü araştırılmıştır. Bu amaçla H₂S'in etkisi L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı inhibitörü nifedipin (10⁻⁵M, 20 dk) ile inkübe edilen damarlarda incelenmiştir. PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin nifedipin (10⁻⁵M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10⁻⁶-3x10⁻³M) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe neden olmamıştır (Kontrol E_{maks}=%70,9±8,61; +Nifedipin E_{maks}=%63,48±3,72 n=9; p>0,05; Şekil 4-9 ve Tablo 4-3).

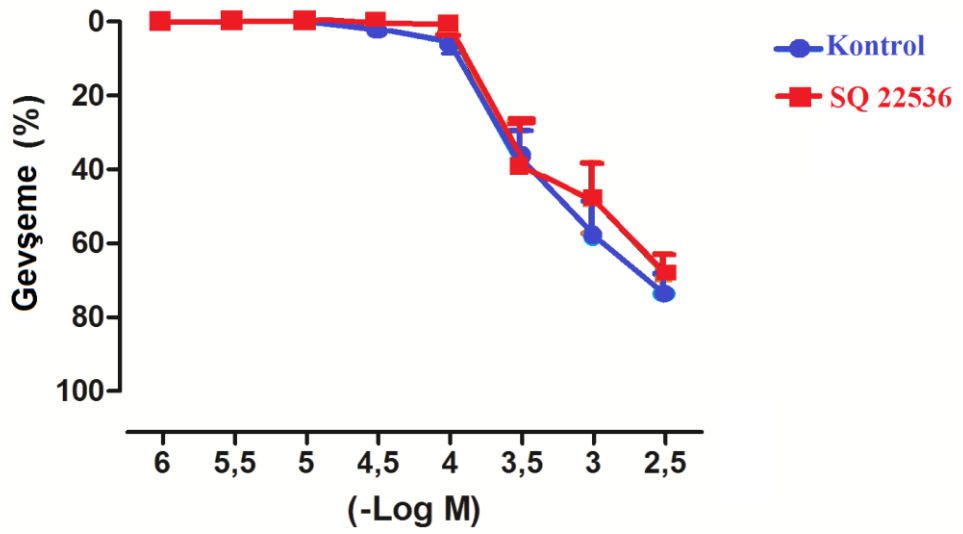


Şekil 4-9: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} \text{M}$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı inhibitörü nifedipinin (10^{-5}M , 20 dk) etkisi.

$p > 0.05$.

4.3.4. Adenilat Siklaz İnhibitörü SQ 22536'nın Etkisi

H₂S'in izole sığır retinal arterleri üzerine etkisinin endotelial vazodilatatör faktörlerin, K⁺ kanalları ve L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı ile ilişkisinin incelenmesinin ardından görülen etkide adenilat siklaz yolağının rolü araştırılmıştır. Bu amaçla H₂S'in etkisi adenilat siklaz inhibitörü SQ 22536 (10⁻⁵M, 20 dk) ile inkübe edilmiş damarlarda incelenmiştir. PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılmış izole sığır retinal arterlerinin SQ 22536 (10⁻⁵M, 20 dk) ile inkübe edilmesi, NaHS'in (10⁻⁶-3x10⁻³M) maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe neden olmamıştır (Kontrol E_{maks}=%73,40±5,00; +SQ 22536 E_{maks}=%68,33±5,44 n=9; p>0,05; Şekil 4-10 ve Tablo 4-3).



Şekil 4-10: $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10^{-6} - $3 \times 10^{-3} \text{M}$) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine adenilat siklaz inhibitörü SQ 22536'nın (10^{-5}M , 20 dk) etkisi.

$p > 0.05$.

Tablo 4-3: PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile prekontrakte edilen izole sığır retinal arterlerinde kümülatif olarak NaHS (10⁻⁵-3x10⁻³M) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı inhibitörü nifedipinin (10⁻⁵M, 20 dk) ve adenilat siklaz inhibitörü SQ 22536'nın (10⁻⁵M, 20 dk) etkisi.

	Prekontraksiyon düzeyi (mN/mm)	E _{maks} (%)	n
Kontrol	1,66±0,13	70,90±8,61	9
+Nifedipin	1,29±0,10	63,48±3,72	9
Kontrol	1,82±0,25	73,40±5,00	9
+SQ 22536	1,82±0,28	68,33±5,44	9

p>0,05 istatistiksel anlamlılık düzeyi.

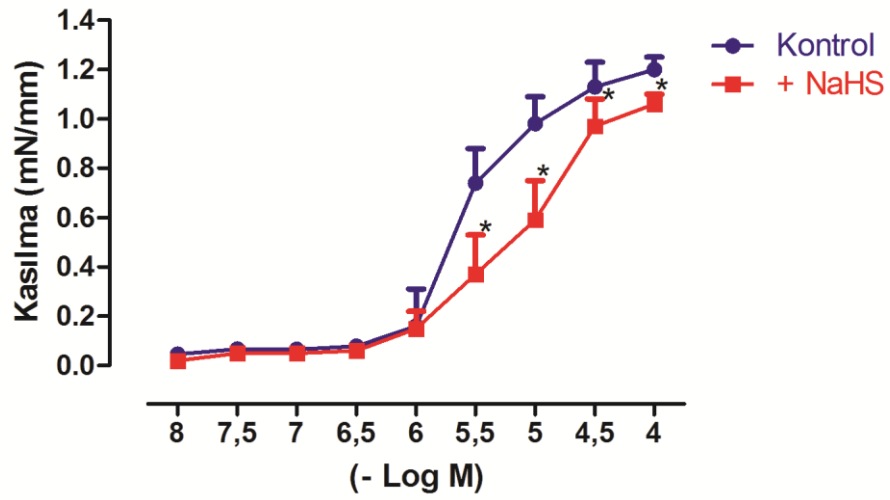
n: retinal arter sayısı.

4.3.5. Hidrojen Sülfürün Spazmojen Ajanların Kasılma Yanıtları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

H₂S'in izole sığır retinal arterleri üzerine gevşetici etkisinin ve görülen bu etkinin mekanizmasının incelenmesinin ardından H₂S'in vasküler reaktivite üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla retinal arterler üzerine artan konsantrasyonlarda kümülatif olarak PGF_{2α} (10⁻⁸-10⁻⁴M) veya K⁺ (10mM-100mM) uygulanması ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin H₂S donörü NaHS (3x10⁻³ M, 20 dk) varlığında değişip değişmediği incelenmiştir.

4.3.5.1. PGF_{2α} (10⁻⁸-10⁻⁴M) Konsantrasyon-Yanıt Eğrisi Üzerine Etkisi

İzole sığır retinal arterlerinde PGF_{2α} (10⁻⁸-10⁻⁴M) ile konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edildikten sonra damarlar NaHS (3x10⁻³M) ile 20 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Damarların NaHS (3x10⁻³M, 20 dk) ile inkübasyonu PGF_{2α} (10⁻⁸-10⁻⁴M) ile elde edilen maksimum kasılma yanıtları ve pEC₅₀ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur (Kontrol E_{maks}=1,20±0,08 mN/mm, pEC₅₀= 5,23±0,07 ve +NaHS E_{maks}=1,06±0,05 mN/mm, pEC₅₀=4,73±0,16 n=7; p<0,05; Şekil 4-11 ve Tablo 4-4).

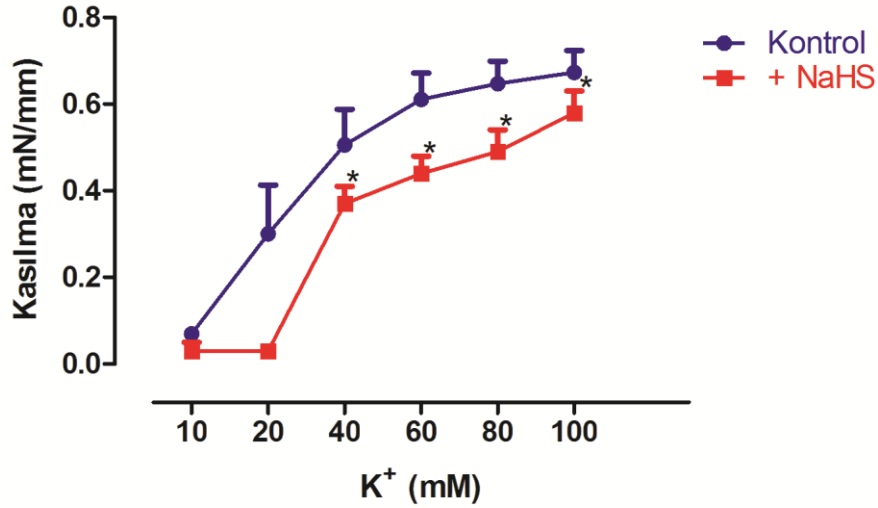


Şekil 4-11: İzole sığır retinal arterlerinin NaHS ($3 \times 10^{-3} \text{M}$, 20dk) ile inkübasyonunun $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-8} - 10^{-4}M) ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine etkisi.

* $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.3.5.2. K^+ (10-100 mM) Konsantrasyon-Yanıt Eğrisi Üzerine Etkisi

İzole sığır retinal arterlerinde K^+ (10-100 mM) ile konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edildikten sonra damarlar NaHS ($3 \times 10^{-3} M$) ile 20 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Damarların NaHS ($3 \times 10^{-3} M$, 20 dk) ile inkübasyonu K^+ (10-100 mM) ile elde edilen maksimum kasılma yanıtlarında ve $-\text{LogEC}_{50}$ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur (Kontrol $E_{\text{maks}}=0,70 \pm 0,05$ mN/mm; $pEC_{50}=1,64 \pm 0,10$ ve +NaHS $E_{\text{maks}}=0,55 \pm 0,04$ mN/mm; $pEC_{50}=1,41 \pm 0,05$ n=7; $p < 0,05$ Şekil 4-12 ve Tablo 4-4).



Şekil 4-12: İzole sığır retinal arterlerinin NaHS ($3 \times 10^{-3} M$, 20dk) ile inkübasyonunun K^+ (10-100 mM) ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine etkisi.

* $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

Tablo 4-4: İzole sığır retinal arterlerinin NaHS ($3 \times 10^{-3} \text{M}$, 20dk) ile inkübasyonunun $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-8} - 10^{-4}M) ve K^+ (10-100mM) ile elde edilen E_{maks} ve pEC_{50} değerlerine etkisi.

	E_{maks} (mN/mm)	pEC_{50}	n
$\text{PGF}_{2\alpha}$			
Kontrol	1,20±0,05	5,23±0,07	7
+NaHS ($3 \times 10^{-3} \text{M}$)	1,06±0,04*	4,73±0,16*	7
K^+			
Kontrol	0,70±0,05	1,64±0,10	7
+NaHS ($3 \times 10^{-3} \text{M}$)	0,55±0,04*	1,41±0,05*	7

* $p < 0,05$ kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

n: retinal arter sayısı

5. TARTIŞMA

Nitrik oksit, prostaglandinler, endotelin-1 vb çok sayıda endojen vazoaaktif madde, damar endoteli ve/veya retinadan salınarak retinal arterlerin tonüsünün lokal olarak düzenlenmesini sağlamaktadır (Maenhaut ve ark. 2007, Haefliger ve ark. 2001). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bir başka endojen faktör olan H₂S'in nitrik oksit benzeri şekilde fizyolojik olaylarda rol aldığı, ayrıca gözde sentezlendiği ve oküler dokularda bulunduğu gösterilmiştir (Persa ve ark. 2006; Pong ve ark. 2007; Opere ve ark. 2009). Gözde fizyolojik olayların işleyişinde lokal vazoaaktif maddelerin büyük rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle, gazotransmitter olarak tanımlanan H₂S'in gözde bulunduğunun ve sentezlendiğinin ortaya konulması fizyolojik olaylarda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, hidrojen sülfürün (H₂S) izole sıgır retinal arteri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. H₂S donörü NaHS'in in vitro uygulanması ile elde ettiğimiz bulgular, H₂S'in izole sıgır retinal arterlerin vasküler tonüsünün düzenlenmesinde rolü olabileceğini açığa çıkarmış ve H₂S'in retinal arterlerde oluşturduğu etkinin mekanizmasının aydınlanmasını sağlayacak sonuçlar ortaya koymuştur.

Retina, farklı hücre çeşitlerini barındıran birden fazla katmandan oluşan ve görme olayının meydana gelmesinde önemli olan bir tabakadır. Retinanın oksijen ve besin ihtiyacı retinal ve koroidal dolaşım adı verilen anatomik ve fonksiyonel olarak farklı iki dolaşım türü ile sağlanmaktadır. Retinal dolaşımın otonomik innervasyonu bulunmamaktadır. Bu nedenle retinal sirkülasyon sistemik dolaşımında bulunan vazoaaktif maddeler veya retina tabakası ve/veya retinal arterlerin endotel tabakasından salınan faktörler ile lokal olarak düzenlenmektedir (Delaey and Van de Voorde 2000, Haefliger ve ark. 2001, Maenhaut ve ark. 2007). H₂S endojen olarak esasen PLP bağımlı ve dokuya spesifik enzimler olan CBS ve CSE ile L-sistein'den üretilmektedir ve nöromodülatör, nöroprotektif, antinosiseptif, antiinflamatuvar, düz kas gevşetici, kardiyoprotektan ve antihipertansif gibi önemli fizyolojik etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Li ve ark. 2006, Gadalla ve Snyder 2010, Liu ve ark. 2012). Ancak retinal sirkülasyondaki önemi henüz aydınlatılamamıştır. Yeni çalışmalar ise H₂S'in

gözde de sentezlendiği belirlenmiş ve retinal kan akımının düzenlenmesinde rolünün olabileceği düşünülmüştür. H₂S'in çeşitli oküler dokularda da varlığı gösterilmiş ve oküler düz kasları gevşettiği ve iris siliyer cisimciklerinde gevşemeye neden olduğu bildirilmiştir (Kulkarni ve ark. 2009). Ancak H₂S'in retinal arter tonüsünün üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Çalışmamızda, H₂S'in kısmen K_v ve K_{ir} kanallarının açılması aracılığı ile retinal arter tonüsünde etkili olabileceği ortaya konmuştur.

NaHS aköz solüsyonlarda [HS⁻] ve [Na⁺] iyonlarına disosiye olmakta ve ardından [HS⁻] su ile reaksiyona girerek H₂S'i meydana getirmektedir. Al-Magableh ve Hart (2011) H₂S'e duyarlı elektrodlar kullanarak yaptıkları çalışmada, NaHS 37 °C sıcaklıkta Krebs solüsyonunda çözündüğünde %10'undan daha az bir kısmının serbest H₂S olarak bulunduğunu bildirmiştir. Buna ilaveten, H₂S'in kan ve dokulardaki fizyolojik konsantrasyonunun 1-300 µM civarında olduğu gösterilmiştir (Abe and Kimura 1996, Zhao ve ark. 2001, Liu ve ark. 2012, Vitvitsky ve ark. 2012). Deneylerimizde kullanılan Krebs solüsyonunun sıcaklığı (37°C) göz önüne alındığında NaHS'in maksimum gevşetici etkisinin görüldüğü konsantrasyon (3mM), H₂S'in fizyolojik düzeyleri ile karşılaştırılabilir seviyededir. Ayrıca, NaHS daha önce yapılmış olan in vitro çalışmalarda 1 µM'dan 10 mM'a varan geniş bir konsantrasyon aralığında kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar da bizim kullandığımız NaHS konsantrasyonuna benzerlik göstermektedir (1 µM-3 mM) (Cheng ve ark. 2004, Cheang ve ark. 2010, Al-Magableh and Hart 2010).

PGF_{2α} ve K⁺'un etki mekanizmaları farklı olan iki spazmojen olduğu bilinmektedir. Damar preparatlarında PGF_{2α} ile elde edilen kasılma yanıtı düz kas hücrelerinde reseptör aracılı kalsiyum kanallarının aktive olması ile meydana gelirken K⁺ depolarizasyonunu indükleyerek kasılma yanıtına neden olmaktadır. İzole sıgır retinal arterlerinin endotel ve düz kas gevşeme kapasitelerini ölçmek amacıyla, damarlar PGF_{2α} ile prekontrakte edilmiş ve kümülatif olarak Ach ve SNP uygulamasıyla konsantrasyon-bağımlı gevşeme yanıtları elde edilmiştir. SNP ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtı Ach ile elde edilenden daha güçlüdür. Bulgularımız, bu iki spazmojen ile prekontrakte edilen sıgır retinal arterlerinde NaHS'in 100 µM ve üzeri

konsantrasyonlarında gevşeme yanıtları oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, damar reaktivitesi üzerinde yapılan deneyler ile paralellik göstermektedir. Retinal arterleri NaHS ile inkübe etmek ($3 \times 10^{-3} \text{M}$, 20 dk) $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve K^+ ile elde edilen maksimum kasılma yanıtlarını ve bu spazmojen ajanlara karşı duyarlılığı düşürmüştür. Bulgularımıza paralel olarak sıçan aorta halkalarında NaHS'in 50-60 μM üzerindeki konsantrasyonlarında gevşeme yanıtını indüklediği bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2001, Sun ve ark. 2011). Bununla birlikte Ali ve ark. (2006) sıçan aorta halkalarında 100 μM 'ye kadar olan konsantrasyonlarda tam tersi bir etki göstermiştir. İlginç olarak, NaHS'in düşük konsantrasyonlarında gözlemlenen kastırıcı etkisi diğer bazı vasküler preparatlarda da, internal meme arterinde (Webb ve ark. 2008) ve sıçan pulmoner arterinde (Sun ve ark. 2011), görülmüştür.

Retinal arter, "arter" olarak adlandırılrsa bile aslında yapısı ve boyutu nedeniyle "arteriyol" olarak tanımlanabilir. Bizim bulgularımız ile paralel şekilde sıçan koroner (Cheang ve ark. 2010), mezenterik (Denizaltı ve ark. 2011) ve serebral (Tian ve ark. 2012) arterlerinde yapılan çalışmalarda NaHS'in 100 μM ve üzeri konsantrasyonda belirgin gevşeme oluşturduğu bildirilmiştir. Retinal arterlerde NaHS ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtının diğer rezistans arterlerin maksimum gevşeme yanıtlarına göre daha az olduğu gözlenmiştir (Cheng ve ark. 2004, Cheang ve ark. 2010, Tian ve ark. 2012). Bununla birlikte bu çalışmalarda uygulanan maksimum NaHS konsantrasyonları bizim çalışmamızda kullandığımızı kıyasla daha yüksektir. Çalışmamızda kullandığımız maksimum NaHS konsantrasyonlarında sıçan mezenterik ve sıçan koroner arterlerinde oluşan NaHS gevşemelerinin benzer düzeylerde olduğu da gözlenmektedir (Cheng ve ark. 2004, Cheang ve ark. 2010, Tian ve ark. 2012).

Retinal arter tonüsünün NO ve vazodilatatör prostaglandinler ile düzenlendiği bilinmektedir (Nielsen and Nyborg 1990, Delaey and Van de Voorde 2000, Pournaras ve ark. 2008). NO ve H_2S arasında sinerjistik bir etkinin olduğu bildirilmiştir (Hosoki ve ark. 1997). Bunlara ek olarak damarların endotel tabakasının ortadan kaldırılması veya endojen nitrik oksit üretiminin bloke edilmesinin de H_2S ile elde edilen gevşeme yanıtını azalttığı gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2001, Cheng ve ark. 2004). İzole domuz

irisinde siklooksijenaz yolağının inhibisyonunun NaHS ile indüklenen gevşemeyi potensiyalize ettiği bildirilmiştir (Monjok ve ark. 2008). Yakın zamanda NaHS'in sığır, domuz ve sıçan retinasında sAMP üretimini stimüle ettiği ortaya konulmuştur (Njie-Mbye ve ark. 2010 ve 2012). Çalışmamızda, retinal arterlerin NO veya siklooksijenaz yolağının bilinen inhibitörleri ile inkübe veya damarın mekanik olarak deendotelize edilmesinin NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtında değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Bu bulgu, izole sığır retinal arterinde NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtında endotel kaynaklı vazodilatatör faktörlerin rol oynamadığını göstermektedir. Daha önce sıçan koroner (Cheang ve ark. 2010) ve serebral (Tian ve ark. 2012) arterlerinde yapılmış olan çalışmaların bulguları da bizim sonuçlarımızı destekler yöndedir. Fare aortasında da NaHS'in damarların endotel tabakasından veya guanilat siklaz, adenilat siklaz yolaklarından bağımsız birşekilde çeşitli iyon kanalları aracılığıyla gevşeme yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir (Al-Magableh ve Hart 2011). Bu veriler de, çalışmamızda guanilat siklaz inhibitörü ve adenilat siklaz inhibitörü varlığında NaHS etkisinde bir değişiklik gözlemlenmediğimiz bulgular ile uyumluluk göstermektedir. Sonuç olarak bulgularımız, NaHS'in sığır retinal arterindeki gevşeme yanıtının endotelden ve endotelyal vazodilatatörler olan NO ve prostasiklinden bağımsız olarak gerçekleştiğini, guanilat/adenilat siklaz yolaklarının aktivasyonu ile ilişkisi bulunmadığını göstermektedir.

Dihidropiridinlere duyarlı L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları düz kas hücrelerinin hücre içi kalsiyum seviyesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Daha önce yapılmış olan bir çalışmada, H₂S'in retinanın ışık ile indüklenen dejenerasyonundan, kalsiyum influksını düzenleyerek koruduğu öne sürülmüştür (Mikami ve ark. 2011). Bir başka çalışmada organ banyosu ortamından kalsiyumu uzaklaştırmanın veya sıçan aortasını nifedipin ile inkübe etmenin H₂S ile indüklenen gevşeme yanıtını azalttığı gösterilmiştir (Zhao ve Wang 2002). Fare aortasında (Al-Magableh ve Hart 2011) ve sıçan serebral arterinde de (Tian ve ark. 2012) benzer gözlemler olduğu ortaya konulmuştur. Bunlara karşın, fare gastrik fundus şeritlerinde H₂S yanıtlarının nifedipine duyarlılığının olmadığı bildirilmiştir (Dhaese ve Lefebvre 2009). Çalışmamızda NaHS'in oluşturduğu gevşeme yanıtı L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokörü nifedipinin varlığında değişiklik göstermemiştir. Bu bulgu H₂S

ile retinal arterde oluşan gevşemenin voltaja duyarlı Ca^{++} kanallarına etkisi aracılığıyla gerçekleşmediğini göstermektedir. Daha önce yapılmış olan çalışmalar ile bizim bulgularımız arasında görülen çelişkinin açıklanmasında; damarların L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal yoğunluklarının, kontraktıl proteinlerin hücre içi kalsiyum seviyelerine olan duyarlılıklarının, damar çeşitlerinin, yapılarının ve boyutlarındaki farklılıkların H_2S 'in etkisinin L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları ile ilişkisinin yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

K^+ kanallarının aktivasyonu ile damarlarda gevşeme yanıtlarının indüklendiği bilinmektedir (Nelson ve Quayle 1995, Hein ve ark. 2006). Fare mezenterik arterlerinde K_{ATP} kanallarının glibenklamid ile bloke edilmesinin NaHS ile indüklenen gevşemeyi azalttığı gösterilmiştir (Cheng ve ark. 2004). Benzer bulgular fare aortasında da elde edilmiştir (Al-Magableh ve Hart 2011). CSE geni silinmiş olan farelerde yapılan bir çalışmada H_2S 'in mezenterik arterler ve aorta düz kasında K_{ATP} , $K_{Ca^{++}}$ ile K_{ir} kanallarını aktive etmek suretiyle hiperpolarizasyona neden olarak gevşeme yanıtını indüklediği gösterilmiştir (Mustafa ve ark. 2011). Bununla birlikte, sıçan koroner arterlerinde ise H_2S 'in gevşeme yanıtında K_{ATP} kanallarının rolünün olmadığı bildirilmiştir (Cheang ve ark. 2010). Ayrıca, sıçan serebral arterlerinde NaHS ile indüklenen gevşeme yanıtının K^+ kanallarının bilinen inhibitörlerine karşı duyarsız olduğu ileri sürülmüştür (Tian ve ark. 2012). Bu veriler, H_2S 'in gevşetici etkisinde K^+ kanallarının rolünün incelenen damar yatağı ve türe göre farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarla benzerlikler ve diğerlerinden ise farklılık göstermektedir. Prekontrakte edilmiş olan retinal arterlerde NaHS ile oluşan gevşeme yanıtının K_{ATP} ve $SK_{Ca^{++}}$ kanallarının aktivasyonu aracılığı ile oluşmadığını ortaya koymakta ve bu bulgu sıçan serebral arterlerinde daha önce yapılmış olan bir çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir (Tian ve ark. 2012). Bununla birlikte, CSE geni silinmiş olan farelerin mezenterik arterleri ve aortalarında (Mustafa ve ark. 2011) ve fare aortasında (Al-Magableh ve Hart 2011) yapılan çalışmalara benzer şekilde 4-AP ve $BaCl_2$ varlığında NaHS yanıtlarında gözlenen istatistiksel anlamlı azalma NaHS'in retinal arterdeki etkisinin K_v ve K_{ir} kanallarının aktivasyonu ile kısmi olarak ilişkili olduğu ortaya koymuştur. Sıçan koroner arterlerinde de bizim sonuçlarımıza paralel şekilde NaHS ile indüklenen gevşeme yanıtının K_v kanal

inhibitörü olan 4-aminopiridinin varlığında azaldığı bildirilmiştir (Cheang ve ark. 2010). Bulgularımız, H₂S'in sıgır retinal arterinde K⁺ kanallarının alt tipleri olan K_v ve K_{ir} kanalları aracılığıyla etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu farklılık hayvanın türü ve deneylerde kullanılan damarın tipi, boyutu ve yapısı ile ilişkili olabilmektedir ve ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak H₂S donörü olan NaHS'in hem PGF_{2α} hem de K⁺ ile prekontrakte edilmiş olan retinal arterlerde gevşeme yanıtı oluşturduğu ve paralel olarak retinal arterlerin her iki spazmogene karşı olan duyarlılığını da azalttığı ortaya koyulmuştur. NaHS'in etkisi endotelden ve endotel kaynaklı vazodilatör faktörlerden, bu faktörlerin aracılık ettiği hücresel mekanizmalardan bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Retinal arterde etkisi bulunan NaHS konsantrasyonları daha önce bildirilen fizyolojik konsantrasyonlar ile uyumludur. Buna göre retinal arter tonüsünün regülasyonunda bilinen lokal vazoaktif maddelerin yanısıra H₂S'in de rol oynayabileceği ortaya konulmuştur. NaHS'in retinal arterler üzerine olan gevşetici etkisi kısmen K_v veya K_{ir} kanallarının aktivasyonu aracılığı ile meydana geldiği düşünülmektedir. Bulgularımız, retinal arter veya ven oklüzyonu, iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, diyabetik retinopati vb retinopatileri indükleyen patolojik durumlarda H₂S'in retinal arter tonüsünü düzenleyerek katkısının olabileceği düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

Abe, K. ve Kimura H. (1996). *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator*. The Journal of Neuroscience, **76(3)**. 1066-1071.

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

Al-Magableh, M. R. ve Hart, J. L. (2011). *Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous production hydrogen sulfide in mouse aorta*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **383(4)**. 403-413.

Ariyaratnam, P., Loubani, M. ve Morice, A. H. (2013). *Hydrogen sulphide vasodilates human pulmonary arteries: A possible role in pulmonary hypertension?* Microvascular Research, **90**. 135-137.

Benedito, S., Prieto, D., Nielsen, P. J. ve Nyborg, N. C. B. (1991a). *Histamine induces endothelium-dependent relaxation of bovine retinal arteries*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **32(1)**. 32-38.

Benedito S, Prieto D, Nielsen PJ ve Nyborg NC., (1991b). *Role of the endothelium in acetylcholine-induced relaxation and spontaneous tone of bovine isolated retinal small arteries*. Exp Eye Res. **52(5)**,575-9.

Bian, J., Yong, Q. C., Pan, T., Feng, Z., Ali, M.A., Zhou S. ve ark. (2006). *Role of Hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **316(2)**. 670-678.

Boussery, K., Delaey, C. ve Van de Voorde, J. (2002a). *Rat retinal tissue releases a vasorelaxing factor*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **43(10)**. 3279-3286.

Boussery K., Franki A.S., Delaey C. ve Van de Voorde J. (2002b) *A vasorelaxing factor is released from mouse retinal tissue*. Ophthalmic Research, **34(3)**. 172-177.

Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C. ve ark. (2010). *Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity*. Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, **30**. 1997-2004.

Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Zaid, A., Giannogonas, P. ve ark. (2012). *cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation*. PLOS ONE, **7(12)**. e53319.

Bursell, S., Clermont, A. C., Oren, B. ve King, G. L. (1995). *The in vivo effect of endothelins on retinal circulation in nondiabetic and diabetic Rats*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **36(3)**. 596-607.

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

Cheng, Y., Ndisang, J. F., Tang, G., Cao, K. ve Wang, R. (2004). *Hydrogen sulphide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats*. American Journal Physiology Heart Circulation Physiology, **287**. H2316-H2323.

Crider, J. Y., Williams, G. W., Drace, C. D., Katoli, P., Senchyna, M. ve Sharif, N.A. (2003). *Pharmacological characterization of a serotonin receptor (5-HT₇)*

stimulating cAMP production in human corneal epithelial cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **44(11)**. 4837-4844.

Delaey, C. ve Van de Voorde, J. (1998a). *The effect of NO donors on bovine retinal small arteries and posterior ciliary arteries.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, **39**. 1642-1646.

Delaey, C. ve Van de Voorde, J. (1998b). *Retinal arterial tone is controlled by a retinal-derived relaxing factor.* Circulation Research, **83**. 714-720.

Delaey, C. ve Van de Voorde, J. (2000). *Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation.* Ophthalmic Research, **32**. 249-256.

Denis, P. ve Elena P. P. (1989). *Retinal vascular beta-adrenergic receptors in man.* Ophtalmologie, **3(1)**. 62-64.

Denizalti, M., Bozkurt, T.E., Akpulat, U., Şahin-Erdemli, I., Abacıoğlu N., 2011. *The vasorelaxant effect of hydrogen sulfide is enhanced in streptozotocin-induced diabetic rats.* Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **383(5)**. 509-517.

Dhaese, I. ve Lefebvre, R. A. (2009). *Myosin light chain phosphatase activation involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus.* European Journal of Pharmacology, **606**. 180–186.

Distrutti, E., Sediari, L., Mencarelli, A., Renga, B., Orlandi, S., Antonelli, E. ve ark. (2005). *Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating K_{ATP} channels.* The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **316(1)**. 325-335.

Donati, G., Pournaras, C. J., Munoz, J.-L., Poitry, S., Poitry-Yamate, C. L.- ve Tsacopoulos, M. (1995). *Nitric oxide controls arteriolar tone in the retina of*

the miniature pig. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **36(11)**. 2228-2237.

Dorner, G. T., Garhofer, G., Kiss, B., Polska, E., Polak, K., Riva, C. E. ve ark. (2003). *Nitric oxide regulates retinal vascular tone in humans*. American Journal of Physiology. Heart Circulation Physiology, **285**. H631–H636.

Du, J., Hui, Y., Cheung, Y., Bin, G., Jiang, H., Chen, X. ve ark. (2004). *The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells*. Heart Vessels, **19**. 75-80.

Duke, H. N. ve Killick, E. M. (1952). *Pulmonary vasomotor responses of isolated perfused cat lungs to anoxia*. Journal of Physiology, **117**. 303-316.

Eto, K., Asada, T., Arima, K., Makifuchi, T. ve Kimura, H. (2002). *Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **293**. 1485–1488.

Gadalla, M. M. ve Snyder S. H. (2010). *Hydrogen sulfide as a gasotransmitter*. Journal of Neurochemistry, **113**. 14-26.

Geng, B., Yang, J., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., Du, J. ve ark. (2004). *H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **313**. 362–368.

Guyton, A.C. ve Hall, J. E. (2001). *Tıbbi Fizyoloji*. Türkçe Çeviri, Nobel Tıp Kitap evi. 566-576.

Haefliger, I. O., Flammer, J. ve Luscher, T. F. (1992). *Nitric Oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **3(7)**. 2340-2343.

Haefliger, I. O., Flammer, J., Beny, J. ve Lüscher, T. F. (2001). *Endothelium-dependent vasoactive modulation in the ophthalmic circulation*. Progress in Retinal and Eye Research, **20(2)**. 209 -225.

Hardy, P., Abran, D., Hou, X., Lahaie, I., Peri, K. G., Asselin, P. ve ark. (1998). *A major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet*. Circulation Research, **83**. 721-729.

Hein T.W., Xu W. ve Kuo L. (2006). *Dilation of retinal arterioles in response to lactate: role of nitric oxide, guanylyl cyclase, and ATP-sensitive potassium channels*. Investigative Ophthalmology&Visual Science, **47(2)**. 693-699.

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

Hughes, M.N., Centelles, M.N. ve Moore, K.P. (2009). *Making and working with hydrogen sulfide. The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review*. Free Radical Biology & Medicine, **47**. 1346-1353.

Ishigami, M., Hiraki,K., Umemura, K., Ogasawara,Y., Ishii, K. ve Kimura, H.(2009). *A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain*. Antioxidants & Redox Signaling, **11(2)**. 205-214.

Johansen, D., Ytrehus, K. ve Baxter, G. F. (2006). *Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury Evidence for a role of K_{ATP} channels*. Basic Research Cardiology, **101**. 53-60.

Kamoun, P. (2004). *Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals*. Amino acids, **26**. 243-254.

Kida, M., Sugiyama, T., Yoshimoto, T. ve Ogawa, Y. (2013). *Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **48**. 211–215.

Kimura, H. (2000). *Hydrogen Sulfide Induces Cyclic AMP and Modulates the NMDA Receptor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **267**. 129–133.

Kimura, H. (2013). *Hydrogen sulfide: Its production and functions*. *Experimental Physiology*, **63(5)**. 492-7.

Kimura, M., Katayama, K. ve Nishizawa, Y. (1999). *Role of glutamate receptors and voltage-dependent calcium channels in glutamate toxicity in energy-compromised cortical neurons*. *Japanese Journal of Pharmacology*, **80**. 351-358.

Kimura, Y. ve Kimura, H. (2004). *Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress*. *The FASEB Journal*, **18**. 1165-1167.

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

Kulkarni, K. H., Monjok, E. M., Zeyssig, R., Kouamou, G., Bongmba, O. N., Opere, C. A. ve ark. (2009). *Effect of hydrogen sulfide on sympathetic neurotransmission and catecholamine levels in isolated porcine iris-ciliary body*. *Neurochemical Research*, **34**. 400–406.

Kulkarni, M., Njie-Mbye, Y. F., Okpobiri, I., Zhao, M., Opere, C. A. ve Ohia, S. E. (2011). *Endogenous production of hydrogen sulfide in isolated bovine eye*. *Neurochemical Research*, **36**. 1540–1545.

Lang, G. K. (2001). *Göz Hastalıkları El Kitabı-Atlas*. Ankara, Palme Yayıncılık. 299-303.

Lee, S. W., Cheng, Y. Moore, P. K., Bian, J. (2007). *Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **358**. 1142–1147.

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

Liang, G. H., Xi, Q., Leffler, C. W. ve Jaggar, J. H. (2012). *Hydrogen sulfide activates Ca^{+2} sparks to induce cerebral arteriole dilatation*. The Journal of Physiology, **590.11**. 2709-2720.

Liu, Y., Lu, M., Hu, L., Wong, P.T.H., Webb, G.D. ve Bian, J. (2012). *Hydrogen sulphide in the mammalian cardiovascular system*. Antioxidants&Redox Signaling, **17/1**. 141-185.

Lowicka, E. ve Beltowski, J. (2007). *Hydrogen sulfide (H_2S) – the third gas of interest for pharmacologists*. Pharmacological Reports, **59**. 4-24.

Maenhaut, N., Boussery, K., Delaey, C., Van de Voorde, J. (2007). *Control of retinal arterial tone by a paracrine retinal relaxing factor*. Microcirculation, **14**. 39-48.

Mani, S. Untereiner, A., Wu, L. ve Wang, R. (2013). *Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis*. Antioxidants&Redox Signaling, doi:10.1089/ars.2013.5324.

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

Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Yamada, M. ve Kimura, H. (2011). *Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca^{+2} influx*. Journal of Biological Chemistry, **286(45)**. 39379-39386.

Monjok, E. M., Kulkarni, K. H., Kouamou, G., McKoy, M., Opere, C. A., Bongmba, O. N. ve ark. (2008). *Inhibitory action of hydrogen sulfide on muscarinic receptor-induced contraction of isolated porcine irides*. Experimental Eye Research, **87**. 612–616.

Mudd, S. H., Skovby, F., Levy, H. L., Pettigrew, K. D., Wilcken, B., Pyeritz, R. E. ve ark. (1985). *The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency*. The American Journal of Human Genetics, **37**. 1-31.

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

Nelson, M. T. ve Quayle, J. M. (1995). *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. The American Journal of Physiology, **268**. 799-822.

Njie-Mbye, Y. F., Bongmba, O. Y. N., Onyema, C. C., Chitnis, M., Kulkarni, M., Opere, C. A. ve ark. (2010). *Effect of hydrogen sulfide on cyclic AMP production in isolated bovine and porcine neural retinae*. Neurochemical Research, **35**. 487-494.

Njie-Mbye, Y. F., Opere, C., Chitnis, M. ve Ohia, S. E. (2012). *Hydrogen sulfide: role in ion channel and transporter modulation in the eye*. Frontiers in Physiology, **3-295**. 1-9.

Nielsen P.J., Nyborg N.C. (1990). *Contractile and relaxing effects of arachidonic acid derivatives on isolated bovine retinal resistance arteries*. Exp Eye Res. **50(3)**,305-11.

Nyborg, N. C. B. ve Nielsen, P. J. (1990a). *Angiotensin-II contracts isolated human posterior ciliary arteries*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **31(11)**. 2471-2473.

Nyborg NC, Nielsen PJ. (1990b) *Thrombin contracts isolated bovine retinal small arteries in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 31(11),2307-13.

Nyborg, N.C. B., Priefo, D., Denedito,S. ve Nielsen, P. J. (1991). *Endothelin-1-Induced contraction of bovine retinal small arteries is reversible and abolished by nitrendipine*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **32(1)**. 27-31.

Okamura, T., Ayajiki, K., Kangawa, K. ve Toda N. (1997). *Mechanism of adrenomedullin-induced relaxation in isolated canine retinal arteries*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **38(1)**. 56-61.

Opere, C. A., Monjok, E. M., Kulkarni, K. H., Njie, Y. F. ve Ohia, S. E. (2009). *Regulation of [3H] D-Aspartate Release from Mammalian Isolated Retinae by Hydrogen Sulfide*. Neurochemical Research, **34**. 1962-1968.

Persa, C., Osmotherly, K., Chen, K. C., Moon, S. ve Lou, M. F. (2006). *The distribution of cystathionine β -synthase (CBS) in the eye: Implication of the presence of a trans-sulfuration pathway for oxidative stress defense*. Experimental Eye Research, **83**. 817-823.

Polak, K., Luksch, A., Frank, B., Jandrasits, K., Polska, E., Schmetterer, L. (2003). *Regulation of human retinal blood flow by endothelin-1*. Experimental Eye Research, **76**. 633–640.

Pong, W. W., Stourcova, R., Frank, N., Kraus, J. P. ve Eldred, W. D. (2007). *Comparative localization of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase in retina: differences between amphibians and mammals*. The Journal of Comparative Neurology, **505**. 158–165.

Pournaras, C. J., Rungger-Brandle, E., Rivac, C. E., Hardarsond, H. H. ve Stefanssond, E. (2008). *Regulation of retinal blood flow in health and disease*. Progress in Retinal and Eye Research, **27**. 284–330.

Qiao, W., Chaoshu, T., Hongfang, J. ve Junbao, D. (2010). *Endogenous hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **396**. 182–186.

Richardson, C. J., Magee, E. A. M. ve Cummings, J. H. (2000). *A new method for the determination of sulphide in gastrointestinal contents and whole blood by microdistillation and ion chromatography*. Clinica Chimica Acta, **293**. 115–125.

Ross, R. (2005). *Atherosclerosis – An inflammatory disease*. Mechanisms of Disease, **340(2)**. 115-123.

Rubanyi, G. M. and Polokoff, M.A. (1994). *Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology*. Pharmacological Reviews, **46(3)**. 325-415.

Senanayake,P., Drazba, J., Shadrach, K., Milsted,A., Rungger-Brandle,E., Nishiyama, K. ve ark. (2007). *Angiotensin II and its receptor subtypes in the human retina*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **48(7)**. 3301-3311.

Shibuya, N.,Tanaka, M., Yoshida,M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K.ve ark. (2009). *3-mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain*. Antioxidants & Redox Signaling, **11(4)**. 703-714.

Shimokawa, H., Flavahan, N. A., Lorenz, R. R. ve Vanhoutte, P. M. (1988). *Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig*. British Journal of Pharmacology, **95**. 1197-1203.

Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y. ve FitzGerald, G. A. (2009). *Prostanoids in health and disease*. Journal of Lipid Research. doi 10.1194/jlr.R800094-JLR200.

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

Sun, Y., Cao, Y., Wang, W. Ma, S., Yao, T. ve Sun, Y. (2008). *Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes*. Cardiovascular Research, **79**. 632-641.

Sun, Y., Tan, C., Du, J. ve Jin, H. (2011). *Hydrogen sulfide and vascular relaxation*. Chinese Medical Journal, **124(22)**. 3816-3819.

Takır, S., Uydeş-Doğan, B. S. ve Özdemir, O. (2011). *Retina evokes biphasic relaxations in retinal artery unrelated to endothelium, K_V , K_{ATP} , K_{Ca} channels and methyl palmitate*. Microvascular Research, **81**. 295–302.

Tan, B. H., Wong P. T.-H. ve Bian, J. S. (2010). *Hydrogen sulfide: A novel signaling molecule in the central nervous system*. Neurochemistry International, **56**. 3-10.

Temple, M. E., Luzier, A. B., Kazierad, D. J. (2000). *Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis*. The Annals of Pharmacotherapy, **34(1)**. 57-65.

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

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

Wang, W., Wang, Z. ve Wu, L. (1997). *Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms*. *British Journal of Pharmacology*, **121**. 927-934.

Wang, Y., Zhao, X., Jin, H., Wei, H., Li, W., Bu, D. ve ark. (2009). *Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice*. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, **29**. 173–179.

Webb, G. D., Lim, L. H., Oh, V. M. S., Yeo, S. B., Cheong, Y. P., Ali, M. Y. ve ark. (2008). *Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **324(2)**. 876-882.

Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K. ve ark. (2008). *H₂S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase*. *National Institutes of Health*, **322(5901)**. 587–590.

Yıldırım, M. (2002). *Resimli İnsan Anatomisi*. İstanbul, Nobel Kitapevi. 148-151.

Zanardo, R. C. O., Brancaleone, V. O., Distrutti, E., Cirino, F. G., Fiorucci S. ve Wallace, J. L. (2006). *Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation*. *The FASEB Journal*, **20**. E1411-E1418.

Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y. ve Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO Journal*, 20(21). 6008-6016.

Zhao, W. ve Wang, R. (2002). *H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms*. *American Journal Physiology Heart Circulation Physiology*, **283**. H474-H480.

Zhao, P., Huang, X., Wang, Z., Qiu, Z., Han, Y., Lu, H. (2009). *Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig*. *European Journal of Pharmacology*, **616**. 223–228.

ETİK KURUL KARARI

Çalışmamız kasaplık sığırlardan elde edilen gözlerle yapılmış olup etik kurul izini gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	GÖĞEM ZEYNEP	Soyadı	ORTAKÖYLÜ
Doğ.Yeri	ÇANAKKALE	Doğ.Tar.	03.01.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	14065717056
Email	zeynep.ortakoylu@hotmail.com	Tel	0535 523 14 31

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İ.Ü. ECZACILIK FAKÜLTESİ	2011
Lise	CAĞALOĞLU ANADOLU LİSESİ	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Almanca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	80	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	80		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word	Çok iyi
Microsoft Excel	Çok iyi
Microsoft Powerpoint	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):