

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NÖROBİLİM DOKTORA PROGRAMI

**DENEYSEL SEREBRAL VAZOSPAZMDA
HİDROJEN SÜLFÜRÜN ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

Ömer Hakan EMMEZ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. M. Kemali BAYKANER

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 01 / 2011-64 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Mayıs 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Nöro bilim Bilim Dalı Doktora Programı
Çerçevesinde Yürütülmüş Olan Bu Çalışma Aşağıdaki Jüri Tarafından
Doktora Tezi Olarak Kabul Edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 19.06.2013

Prof. Dr. Hayrunnisa BOLAY
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. M. Kemali BAYKANER
Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet KİTAPÇI
Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Yıldırım SARA
Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Aylar POYRAZ
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER	iv
TABLolar	vi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Anevrizmal Subaraknoid Kanama	3
2.2. Serebral Kan Akımı Fizyolojisi	4
2.3. Serebral Vazospazm	5
2.3.1 Serebral Vazospazmın Patogenezi	6
2.4. Hidrojen Sülfür	7
2.4.1. Hidrojen Sülfürün Fiziksel Özellikleri	7
2.4.2. Hidrojen Sülfürün Üretimi	11
2.4.3. Hidrojen Sülfürün Santral Sinir Sisteminde Etkileri	15
2.4.4. Santral Sinir Sistemi Hastalıklarında Hidrojen Sülfürün Rolü	28
3. YÖNTEM VE GEREÇ	30
3.1. Hayvanların Hazırlığı	30
3.2. Cerrahi Prosedür	31
3.2.1. Deneysel Subaraknoid Kanama Oluşturulması	31
3.2.2. Dekapitasyon ve Doku Örneklerinin Alınması	33
3.3. Deney Grupları	36
3.4. Histopatolojik Değerlendirme	37
3.4.1. Baziler Arter Lümen Çapı ve Duvar Kalınlığı Ölçümleri	37
3.4.2. İmmünohistokimyasal İnceleme	38
3.5. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1. Baziler Arter Lümen Çapı	40
4.2. Baziler Arter Duvar Kalınlıkları	43
4.3. Beyin Sapı CBS Ekspresyonu	44

4.4. Baziler Arter CBS Ekspresyonu	50
4.5. Beyin Sapı CSE Ekspresyonu	52
4.6. Baziler Arter CSE Ekspresyonu	56
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇLAR.....	65
7. ÖZET.....	66
8. SUMMARY.....	68
9. KAYNAKLAR.....	70
10. EKLER ETİK KURUL ONAY	82
11. TEŞEKKÜR.....	84
12. ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER

ŞEKİL 1: CBS VE CSE'NİN SÜLFÜR METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ:.....	12
ŞEKİL 2: H ₂ S'İN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDE OLASI ETKİ MEKANİZMASI.....	15
ŞEKİL 3: H ₂ S'İN BİOSENTEZ YOLAĞI VE GLUTAMATERJİK NÖRONLARDAKİ ETKİ MEKANİZMASINI BİRLİKTE ANLATAN MODEL.....	22
ŞEKİL 4: H ₂ S'İN DÜZ KAS HÜCRELERİNDEKİ ÜRETİM KONTROL MEKANİZMASI VE KAS GEVŞETİCİ ÖZELLİĞİNİN MODELİ.....	27
RESİM 1: SİSTERNA MAGNA PONSİYONU İÇİN YAPILAN İNSIZYON.....	32
RESİM 2: SİSTERNA MAGNAYA OTOLOG ARTERİEL KAN ENJEKSİYONU	32
RESİM 3: DEKAPİTASYON ÖNCESİ BEYİN SAPI, SEREBELLUM VE SEREBRUM	33
RESİM 4: DEKAPİTASYON.....	34
RESİM 5: KONTROL GRUBUNA AİT BİR BEYİN SAPI VE BAZİLER ARTER ÖRNEĞİ	34
RESİM 6: SAK YAPILMIŞ BİR DENEĞİN BEYİN VE BEYİN SAPI YAPILARI, ANTERİORDAN GÖRÜNÜM	35
RESİM 7: SAK YAPILMAMIŞ BİR DENEĞİN BEYİN VE BEYİN SAPI, ANTERİORDAN GÖRÜNÜM.....	35
RESİM 8: SAK GRUBUNDAKI DENEKLERDEN BİRİNE AIT VAZOSPAZMLI BAZİLER ARTER KESİTİ	41
RESİM 9: NAHS GRUBUNDAKI DENEKLERDEN BİRİNE AIT BAZİLLER ARTER KESİTİ	42
RESİM 10: BEYİN SAPI VE BAZİLLER ARTER KESİTİ (H&E X 40).....	45
RESİM 11: CBS EKSPRESYONU OLMAYAN BEYİN SAPI PREPERATI. (CBS ANTİKORU, STREPTAVİDİN-BİOTİN PEROKSİDAZ X 400.....	48
RESİM 12: HAFİF ŞİDDETE (+) CBS EKSPRESYONU OLAN BEYİN SAPI PREPERATI. (CBS ANTİKORU, STREPTAVİDİN-BİOTİN PEROKSİDAZ X 400	48
RESİM 13: ORTA ŞİDDETE (++) CBS EKSPRESYONU OLAN BEYİN SAPI PREPERATI. (CBS ANTİKORU, STREPTAVİDİN-BİOTİN PEROKSİDAZ X 400	49
RESİM 14: YÜKSEK ŞİDDETE (+++) CBS EKSPRESYONU OLAN BEYİN SAPI PREPERATI. (CBS ANTİKORU, STREPTAVİDİN-BİOTİN PEROKSİDAZ X 400	49
RESİM 15: CSE EKSPRESYONU OLMAYAN BEYİN SAPI PREPERATI. (CSE ANTİKORU, STREPTAVİDİN-BİOTİN PEROKSİDAZ X 400.....	54

RESİM 16: HAFIF ŞİDDETE (+) CSE EKSPRESYONU OLAN BEYİN SAPI PREPERATI. (CSE ANTİKORU, STREPTAVIDİN-BIOTİN PEROKSIDAZ X 400	54
RESİM 17: ORTA ŞİDDETE (++) CSE EKSPRESYONU OLAN BEYİN SAPI PREPERATI. (CSE ANTİKORU, STREPTAVIDİN-BIOTİN PEROKSIDAZ X 400	55
RESİM 18: YÜKSEK ŞİDDETE (+++) CSE EKSPRESYONU OLAN BEYİN SAPI PREPERATI. (CSE ANTİKORU, STREPTAVIDİN-BIOTİN PEROKSIDAZ X 400	55
GRAFİK 1: BAZİLER ARTER LÜMEN ÇAPININ GRUPLAR ARASINDAKİ DAĞILIMINI GÖSTEREN GRAFİK.....	42
GRAFİK 2: BAZİLER ARTER DUVAR KALINLIĞININ GRUPLAR ARASINDA DAĞILIMINI GÖSTEREN GRAFİK.....	44
GRAFİK 3: TÜM GRUPLARDA BEYİN SAPI CBS EKSPRESYONU ŞİDDETİNİ GÖSTEREN GRAFİK	47
GRAFİK 4: TÜM GRUPLARDA BAZİLER ARTER CBS EKSPRESYONU ŞİDDETİNİ GÖSTEREN GRAFİK.....	51
GRAFİK 5: TÜM GRUPLARDA BEYİN SAPI CSE EKSPRESYONU ŞİDDETİNİ GÖSTEREN GRAFİK	53
GRAFİK 6 : TÜM GRUPLARDA BAZİLER ARTER CSE EKSPRESYONU ŞİDDETİNİ GÖSTEREN GRAFİK.....	57

TABLolar

TABLO 1: ÜÇ ENDOJEN GAZIN (NİTRİK OKSİT (NO) HİDROJEN SÜLFAT (H ₂ S) KARBON MONOKSİT (CO) FİZYOİKİMSAYAL VE BİYOLOJİK KARŞILAŞTIRMASI	10
TABLO 2: MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDE HİDROJEN SÜLFAT TARAFINDAN İNDÜKLENEN ÖNEMLİ SİNYAL İLETİMLERİ.....	23
TABLO 3: TÜM GRUPLARA AİT BAZİLER ARTER LÜMEN ÇAPI VE DUVAR KALINLIĞI DEĞERLERİ	40
TABLO 4: TÜM GRUPLARDA BEYİN SAPI CBS EKSPRESYONU ŞİDDETİNİ GÖSTEREN TABLO	46
TABLO 5: TÜM GRUPLARDA BAZİLER ARTER CBS EKSPRESYON ŞİDDETİNİ GÖSTEREN TABLO	50
TABLO 6: TÜM GRUPLARDA BEYİN SAPI CSE (CTH) EKSPRESYON ŞİDDETİNİ GÖSTEREN TABLO	52
TABLO 7: TÜM GRUPLARDA BAZİLER ARTER CSE EKSPRESYON ŞİDDETİNİ GÖSTEREN TABLO	56

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

H ₂ S	hidrojen sülfür
HS ⁻	sülfid anyonu
SSS	santral sinir sistemi
SAK	subaraknoid kanama
NO	nitrik oksit
CO	karbon monoksit
CBS	sistationin beta sentetaz
cGMP	siklik guanozin monofosfat
CSE	sistationin gama liyaz
K _{ATP}	ATP bağımlı potasyum kanalları
NOS	nitrik oksit sentetaz
PLP	pidoksal-5 fosfat
PAG	D,L- propargilglisin
CNA	β-siyano-L-alanin
SAM	s-adenozil-metyonin
Met	metiyonin
Cys	sistein
Hcy	homosistein
LTP	uzun dönem potansiyel
PKA	cAMP bağımlı protein kinaz
ROS	reaktif oksijen metabolitleri
NMDA	N-metil-d-aspartat
cAMP	siklik adenozin monofosfat

GABA	gama amino butirik asit
TNF- α	tümör nekrosis faktör- α
IL-1 β	interlökin 1 β
AC	adenil siklaz
NaHS	sodyum hidrosülfid
RTK	reseptör tirozin kinaz
EGFR	epidermal growth faktör reseptörü
MAPK	mitojen aktive protein kinaz
ERK	ekstraselüler sinyal ilişkili kinazlar
EDRF	endotel derived releasing factor
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
OSA	orta serebral arter
im	intramuskuler
ip	intraperitoneal
EDHF	endotel kökenli hiperpolarizasyon faktörü
AOAA	amino oxyasetik asit (o-karboksimetil hidroksilamin hemiklorid)

1. GİRİŞ

Anevrizmal subaraknoid kanama, serebral arterlerin özellikle dallanma bölgelerinde gelişen anevrizmaların kanaması ile ortaya çıkan bir patolojidir. Anevrizmal subaraknoid kanama, en sık görülen dördüncü inme nedenidir. Serebral vazospazma neden olarak, hem serebral kan akımını azaltarak, hem de kafa içi basıncı arttırarak yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Kaba bir tahminle anevrizmal subaraknoid kanama geçiren hastaların sadece %10-20'si eski nörolojik ve bilişsel kapasitelerine ulaşabilmektedir. Bu kötü sonuca neden olan etkenlerin başında serebral vazospazm gelir. Serebral vazospazm, serebral arterlerin kalıcı, şiddetli ve geri dönüşümlü daralması olarak tarif edilebilir. Ancak bu daralma yaygın ve çok şiddetli olduğunda, serebral kan akımını kritik düzeylerin altına indirmekte ve serebral iskemi yada infarkta neden olmaktadır. Anevrizma nedenli subaraknoid kanamalarda nadir görülmesi ve bilinen vazodilatatör ajanlara cevap vermemesi gibi özellikler bakımından halen bilinmezliklerle dolu bir patolojidir. Neredeyse yarım yüzyıldır, serebral vazospazm konusunda geniş çapta araştırmalar yapılmakla beraber, halen nedenleri ve tedavisi hakkında istenen noktaya gelinememiştir. Etyolojisinde en çok suçlanan ajanlar kan yıkım ürünleri olmuştur. Tedavide birçok vazodilatatör ajan denenmiş, bunlar içinde kalsiyum kanal blokörleri ön plana çıkmış ancak klinikte istenen başarıya ulaşılammıştır. Günümüzde semptomatik tedavi en geçerli yöntem olup hemodilüsyon, hipertansiyon, hipervolemi uygulanmakta, etkin ajan bulunmamaktadır.

Hidrojen sülfür, vücutta nitrik oksit ve karbon monoksitten sonra saptanmış, oldukça yeni bir gaz nörotransmitterdir. Geçmişte tamamen toksik özellikleri nedeniyle bilinen hidrojen sülfürün özellikle kardiyovasküler sistemde vazodilatasyon yapıcı özelliğinin keşfinden sonra, diğer sistemlerde de etkileri incelenmeye başlanmıştır. Santral sinir sisteminde de hidrojen sülfürün rolü birçok fizyolojik ve patolojik

mekanizma içinde gösterilmiştir. Özellikle serebrovasküler sistemde yapılan incelemeler serebral arterlerde fizyolojik ve patolojik olaylarda hidrojen sülfürün varlığını desteklemektedir. Nörolojik, kardiyovasküler, gastrointestinal, genitoüriner ve endokrin sistemlerde birçok etkisi saptanan, birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynadığı giderek artan biçimde anlaşılan H₂S'in serebrovasküler sistemdeki rolü tartışmalıdır. İskemik inmede infarkt alanını daralttığı, vasodilatasyon yaptığını gösteren çalışmalara karşın, birçok çalışmada da serebral iskemide nöronal hasara yol açtığı iddia edilmektedir. Periferik vazodilatatör etkinliği bilinen H₂S'in serebral vazospazmdaki rolü bilinmemektedir. Hidrojen sülfürün, anevrizmal subaraknoid kanamaya ikincil gelişen vazospazmdaki rolü ve önemi konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada deneysel olarak normal ve serebral vazospazm yaratılmış ratlarda H₂S donör ve inhibitörleri verilerek, beyin sapı ve baziler arterde H₂S düzeylerinin saptanması, serebral vazospazmın nasıl etkilendiğinin belirlenmesi ve damar çaplarıyla H₂S düzeyleri arasındaki ilişkinin saptanması amaçlanmıştır. Elde edilecek bilgilerin, hem serebral vazospazm gelişiminde daha önce hiç çalışılmamış bir molekülün rolünü ortaya koyacağına hem de oynadığı role göre serebral vazospazm tedavisinde günümüzde üzerinde çalışılan ajanlardan çok daha farklı moleküllerin gündeme gelmesi ve kullanılmasını, daha başarılı sonuçlar alınmasını sağlayacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anevrizmal Subaraknoid Kanama

Serebrovasküler hastalıklar arasında aterotromboz, emboli ve primer intraserebral kanamayı takiben 4. sıklıkta yer alan subaraknoid kanama (SAK), inme olgularının yaklaşık %5'ini oluşturur ¹. Anevrizmal subaraknoid kanama 6-11/100000 insidansa sahiptir ². Tüm subaraknoid kanamaların %75-80'i anevrizmaldir ³. Serebral arter anevrizmaları ve bunların yırtılmasına bağlı SAK oluşumu 18.yy'da Morgagni ve Biuni tarafından ilk kez tanımlanmıştır ⁴. 1891'de Quincke'nin lomber ponksiyonu tanımlamasından sonra SAK tanısı konulmaya başlamış ve anevrizmaların tanı-tedavisinde başlangıç olmuştur ⁴.

Anevrizmal subaraknoid kanamaların %75-85'inde neden anevrizmalardır. Egas Moniz'in 1927'de serebral anjiyografiyi uygulamaya başlamasıyla anevrizma tanısı kesin olarak konur hale gelmiştir. Yaygınlığı ve önemi da artmıştır ⁴. Prevalans otopsi çalışmalarında %0.2-7.9 arasında değişmekle beraber çoğu çalışmada %1-3 olarak raporlanmıştır. Fin ve Japon toplumlarında daha sık izlenmektedir. Kadınlarda 1.6 kat daha fazla izlenmekte ve sıklıkla 40-60 yaşlar arasında ortaya çıkar ⁵.

SAK'ın tipik kliniği ani, şiddetli baş ağrısıdır ve %97 oranında izlenir. Bilinç kaybı gelişmeyen hastalar, hayatının en şiddetli ağrısı olarak tarif ederler. %30 hastada bilinç bozukluğu gelişmektedir ve 6-24 saat arasında %98 ense sertliği gelişir. Kanamaların %70'i efor esnasında ve hipertansiyon zemininde gelişir. SAK'da klinik tabloya göre hastanın durumunu sınıflayan ve prognoz hakkında da bilgi veren Hunt Hess, Yaşargil gibi evrelendirme sistemleri bulunmaktadır ³.

SAK'nın %30 morbiditesi, %40-50 oranında morbiditesi bulunmaktadır. Kabaca SAK geçiren 10 hastadan bir veya ikisi kanama öncesi durumunu geri kazanabilmektedir ³. Cerrahi veya endovasküler tedavi ile anevrizmanın tedavi edilmesi %90 mortal olan ikinci kanamayı önlemekle beraber kanamanın yarattığı hasarı düzeltmede maalesef pek etkili değildir. Bunun nedenleri, kanamanın neden olduğu serebral dolaşım bozukluğu ve nöronal hasardır. SAK sonrası çekilen anjiyografilerde %70-80 oranında anevrizma ile ilişkili arterde veya yaygın vazospazm izlenir. Kafa içi basınç artışı da klinik tabloda önemli yere sahiptir.

Tanıda günümüzde öncelik, bilgisayarlı tomografiyle SAK'ın tespitidir. Daha sonra konvansiyonel anjiyografi, bilgisayarlı tomografik anjiyografi veya manyetik rezonans anjiyografi ile anevrizma saptanır. Bilgisayarlı tomografide SAK saptanmayan ama klinik tablosu SAK'la uyumlu hastalarda lomber ponksiyon ile tanı konabilir.

Tedavide temel yöntem mikrocerrahi ile anevrizmanın dolaşım dışında bırakılmasıdır ancak son yıllarda geliştirilen endovasküler tekniklerle anjiyografi eşliğinde anevrizmaların içi özel sarmallarla doldurularak veya stentle içine kan girişi önlenerek etkili biçimde tedavi edilmektedir.

2.2. Serebral Kan Akımı Fizyolojisi

Erişkin insan beyni toplam vücut ağırlığının %2'sini oluşturmasına rağmen, kalp atımının %15'ini alır. İstirahat halinde beyin kan akımı 50ml/100gr/dak'dır. 3 saat 10ml/100gr/dak kadar sürmesi halinde beyin ölümü gerçekleşir. Beyin kan akımı 10-12ml/100gr/dak olduğunda EEG'de izoelektrik durum ortaya çıkar. Beyin tüm vücudun oksijen tüketiminin %25'inden sorumludur ve bu oksijenin %60' elektriksel aktivite için gerekli ATP sentezinde gereklidir. Eğer 3-8 dakika kadar kan akımı durursa, ATP depoları boşalır ve geri dönüşümsüz beyin hasarı başlar. Oksijen ve glukoz bağımlı çalışan sinir sisteminde, bu maddelerin

kesintisiz sağlanması serebral kan akımı sayesinde. Bu nedenle serebral kan akımındaki sorunlar önemli sorunlar doğurur ⁶. Serebral kan akımını arttıran vazodilatasyon temelde üç mekanizma ile gerçekleşir. İlk ikisi cGMP aktivasyonu ve cAMP aktivasyonu ile protein kinazların aktivasyonu sayesinde hücre içi kalsiyumun azaltılarak damar düz kasında gevşeme sağlanmasıdır. Üçüncü mekanizma ise potasyum kanallarının aktivasyonudur. Böylece hücre dışına potasyum akımı gerçekleşir ve damar düz kasında hiperpolarizasyon oluşur. Hiperpolarizasyon sonucu kalsiyum kanalları kapanır ve damar düz kasında gevşeme oluşur ⁷.

Tüm çalışmalar SAK'da global serebral kan akımının azaldığını göstermektedir ². Kan akımının evre 1 ve 2 SAK'lı hastalarda 54ml/100gr/dak.'dan 42ml/100gr/dak'ya, evre 3 ve 4 hastalarda 36 ml/100gr/dak'ya kadar, hem de vasospazm olmaksızın düştüğü gösterilmiştir ². İleri evre komadaki hastalarda serebral kan akımındaki azalmanın uzun sürdüğü saptanmıştır ².

2.3. Serebral Vazospazm

Serebral vazospazm, SAK sonrası serebral arterlerin uzun süreli, şiddetli, geri dönüşümlü daralması olarak tanımlanabilir. Subaraknoid aralıktaki kan miktarı ile vazospazm şiddeti ilişkilidir. Klinik vazospazm aynı zamanda 'gecikmiş iskemik nörolojik defisit' olarak da adlandırılır. Klasik olarak kanamanın 3 ile 7. günleri arasında gelişir ve 14. günden sonra geriler. Ancak bu dönemdeki şiddetine göre çok ağır sonuçlar doğurabilir. Anjiyografik vazospazm yaklaşık %70-80 oranında izlenirken, klinik vazospazm ise %30 kadar hastada gözlenir. SAK sonrası serebral infarkt %26 oranında izlenir ⁸. Tanıda nörolojik kötüleşme en tipik bulgu olup, transkranyal doppler, anjiyografi gibi yöntemlerle desteklenir. Anevrizma rüptürü ile oluşan subaraknoid kanamadan sonra 4-12 gün içinde fokal veya yaygın biçimde serebral arterlerde daralma ve buna bağlı nörolojik defisitlerle karakterize vazospazm, düzelmemesi halinde ölümle

sonuçlanabilmektedir. Günümüzde SAK' a bağlı kötü sonuç gelişiminde birinci neden vazospazmdır ve tedavisinde halen istenen etkinlikte bir ajan bulunamamıştır.

2.3.1 Serebral Vazospazmın Patogenezi

Vazospazm, damar düz kas kasılmasına bağlı olarak ortaya çıkan uzamış serebral arteriel konstriksiyondur. Vazospazm nedeniyle ölen hastaların otopsilerinde beyin kapiller ven, arter ve arteriollerinde morfolojik değişiklikler saptanmıştır. Subaraknoid kanamadan iki saat sonra endotel hücreleri yuvarlaklaşır ve yüzeyleri kabalaşır. Subendotelyal bölgede bazal membrana benzer madde artımı ile intima kalınlaşır. Zamanla intersellüler mesafenin elektron yoğunluğu azalır. İntimal harabiyete bağlı intrasellüler vakuoller ve yoğun cisimler belirir. Endotel hücreleri lamina elastikadan ayrılıp dejenere halde lümene dökülmeye başlarlar. İntima 4. ayda subendotelyal elektron yoğun amorf maddeler birikimi dışında tamamen normale döner. İntima kalınlaşması 4 haftadan fazla devam ederse sekel olarak kalır. Tunika mediadaki dejenerasyon SAK'dan 2 saat sonra granüler membrana bağlı kavitenin görülmesi ile başlar, yer yer lizozoma benzer elektron yoğun cisimlere rastlanır. Stromada yoğun partiküller ve bazal membrana benzer maddelerin varlığı dikkati çeker. Daha sonra hücre içi vakuol ve yoğun maddelerinde artma olur. Stromada kollajen ve elastik lif proliferasyonu oluşarak myoflamanlarda artifakt ile büyük vakuoller oluşur. Kas hücreleri gerilir. Çekirdek piknotik hal alır. Zamanla kaslarda hücre sayısı azalır. Nekroz, ödem ve fibrozis gelişir. Subaraknoid kanamadan 24 ay sonra hücreler arasında yer yer görülen lizozoma benzer maddeler dışında damar düz kasları normale döner. Subaraknoid kandan yayılan hemoglobin, kalsiyum giriş ve salınımını tetikler. Bu sayede kalsiyum/kalmodulin bağımlı myozin hafif zincir kinazı aktive olur. Bunun sonucunda myozin hafif zinciri fosforile olur ve aktin-myozin çapraz bağı indüklenir. Sonuçta düz kas

kasılması gerçekleşir. Bu kasılma ATP ve kalsiyum gerektirir. Hücre dışı kalsiyum, hücre içi kalsiyumdan daha önemli rol oynarken, voltaj bağımlı ve reseptör bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla girer. Kronik vazospazm ATP ve kalsiyum gerektirmez. Protein kinaz C, Rho kinaz ve protein tirozin kinaz gibi kontraktıl proteinler temel mekanizmayı oluşturmaktadır. Kronik vazospazmın, ortamda kalsiyum olmadan da gelişebilmesi ve klasik vazodilatör ajanlara yanıt vermemesi de bu mekanizmayı desteklemektedir⁸. Günümüzde popüler olan kalsiyum kanal blokürlerinin beklendiği kadar etkili olmaması da vazospazmın bilinen damar düz kas kasılma mekanizması ile gelişmediğinin bir göstergesidir. Vazospazm sadece damarda daralma değil, vasküler duvarlarda ultrastrüktürel hasar, endotel hücrelerinde vakuolizasyon, internal elastik laminada kırılmalar ve tunika mediada myonekrozla karakterize bir patolojidir.

Pıhtıda bulunan oksihemoglobinin oto-oksidasyonu ile ortaya çıkan superoksid anyon radikalleri lipid peroksidasyonuna neden olur⁸. Lipid peroksidleri ve hidroksil radikalleri damar duvarına penetre olur, endotel hücresi ve düz kas hücrelerine zarar verir⁸. Bu hasar sonucunda NO sentezinde azalma ve/veya endotelinin aşırı salınımı gibi olayların SAK'ta vazospazm gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülür⁸.

Patogenezde inflamatuvar sitokinlerin özellikle damar duvar hasarında rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmakla beraber tek başına sorumlu olduğunu iddia etmek mümkün gözükmemektedir⁸.

2.4. Hidrojen Sülfür

2.4.1. Hidrojen Sülfürün Fiziksel Özellikleri

Hidrojen sülfür kimyasal reaktif olarak kullanılan zehirli bir gazdır. 1796'da C. Louis Berthallet tarafından bileşiği oluşturan elementler belirlenmiştir. Kaynama noktası -60.75°C , erime noktası -83.70°C 'dir. Su ve alkolde çözünür. Yanıcı bir gazdır.

Hidrojen sülfür, suyun sülfür analogu olup, moleküler ağırlığı 34.08'dir. Ancak suyun aksine moleküller arası güçler zayıf olduğu için, oda ısısı ve basıncında gaz formunda bulunur. Renksiz bir gaz olup, çürük yumurta gibi kokar. Memeli vücudunda, fizyolojik pH'da H₂S'in üçte biri ayrışmamış olarak, üçte ikisi ise hidrosülfid anyonu (HS⁻) olarak bulunur⁹. Yağda çözünebilir olması nedeniyle hücre membranlarını kolaylıkla geçer.

Hidrojen sülfür, eski dönemlerde tamamen toksik yönden incelenirken, günümüzde fizyolojik etkileri ve terapötik potansiyeli ortaya konulmuştur ve giderek artan bir ilgi merkezi haline gelmiştir. Vücuttaki birçok sistemde geniş spektrumlu toksik etkileri vardır. Hidrojen sülfüre maruziyetin erken semptomları, boğaz ağrısı, baş dönmesi, bulantı ve hava yolu iritasyonuna bağlı solunumsal bozukluklardır. Akut maruziyette doz bağımlı olarak santral sinir sistemi (SSS) ve solunum baskılanması oluşabilir⁹. Solunum paralizisi, H₂S zehirlenmelerinde ölümün asıl sebebidir. Hidrojen sülfür zehirlenmesine bağlı ölümlerde, otopside en belirgin bulgu pulmoner ödemdir¹⁰. Bu toksik etkinin mekanizması bugün için tam olarak bilinmese de H₂S'in mitokondride düşük mikromoleküler konsantrasyonlarda sitokrom c oksidazı geri dönüşümlü inhibe ettiğine inanılır¹¹.

Rat, insan ve inek dokularında yüksek konsantrasyonda bulunduğunu (50-160µmol/L) gösteren çalışmalar olmakla beraber, daha yeni çalışmalarda nanomolar konsantrasyonlarda bulunduğu gösterilmiştir^{9,12,13,14}. Kanda yaklaşık 14nM konsantrasyonunda bulunmaktadır¹⁵. H₂S'in etkileri tipik olarak 10-300µM konsantrasyonlarında ortaya çıkmaktadır. Bu düzey 2000 yılından bu yana en az 20 çalışmada bildirilen düzey ile uyumludur. 2000 yılından önce ise plazma düzeyi çok düşük bulunmuştur veya saptanamamıştır. Bu farklılık ölçüm metodlarındaki farklılıklar ve yetersizlikler nedeniyle oluşmaktadır¹⁵.

Nitrit oksid ve karbon monoksidden sonra vücutta gaz halinde bulunan üçüncü nörotransmitterdir. Bu üç gaz nörotransmitterin özellikleri tablo 1'de özetlenmiştir ¹⁶.

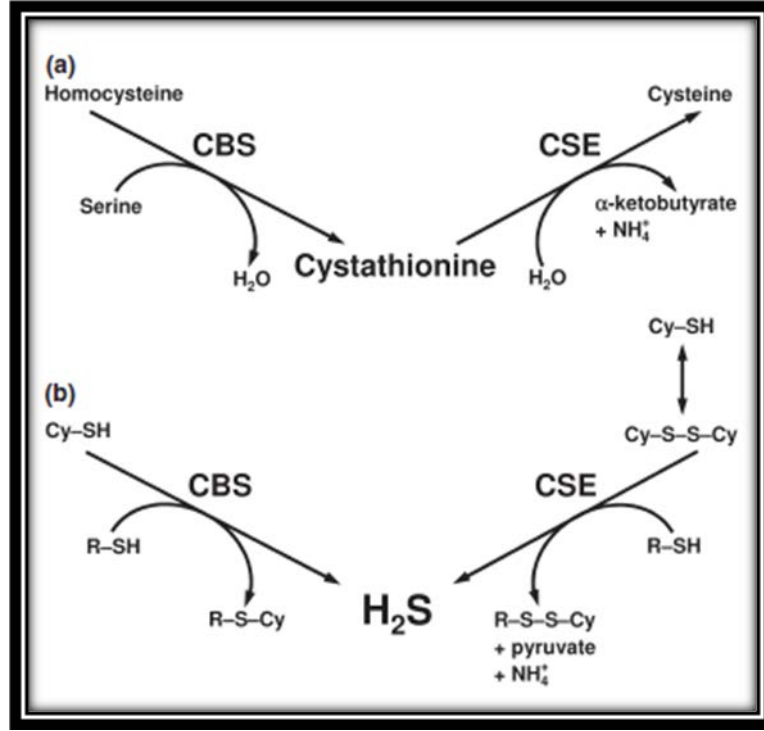
Tablo 1: Üç endojen gazın (nitrik oksit (NO) hidrojen sülfat (H₂S) karbon monoksit (CO) fizyokimyasal ve biyolojik karşılaştırması ¹⁶.

	Nitrik oksit	Karbonmonoksit	Hidrojen Sülfat
Çevre toksikoloji	İçten yanmalı motorlardan kaynaklanır	Karbon içeren bileşimlerin yanması sonucu oluşur. Örn volkanik patlamalar içten yanmalı motorlar	Bataklık, lağım çürüme kökenli
Endojen köken	Çeşitli dokularda nitrik oksite sentetaz tarafından L-argininden üretilir (nNOS=NOS1, iNOS=NOS2, eNOS=cNOS=NOS3)	Çeşitli dokularda hem oksijenaz1 ve hem oksijenaz2 katalizörlüğünde üretilir.	Çeşitli dokularda CBS ve/veya CSE tarafından L-sisteinden üretilir
Farmakolojik baskılayıcı	Guanidin ve L-arginin derivasyonları aminoguanidin ve γNMMA	Hem-oksijenaz inhibitörleri (Zn-protoporfirin Sn-mesoporfirin	CBC veya CSE inhibitörleri (örn:βsiyanoalanin propargilglisin)
Yarılanma kinetiği	Saniyeler içinde. Metabolitleri nitrit nitrat nitrotiyoller	Dakikalar içinde. Karboksihemoglobulin şeklinde taşınır	Dakikalar içinde. Metabolitleri: tiyosülfat, sulfid, sülfat
Tetikleyici receptör ve hedef	K _{Ca} kanalları, sitokrom-o-oksidad PARP	sGC/cGMP, sitokrom-c-oksidad	KATP kanalları, sitokrom-c-oksidad, ERKs, fosfotidil inositol kinaz3/Akt yolağı(PI3-K/Akt)
Vasküler etkisi	Vazodilatasyon	Vazodilatasyon	Vazodilatasyon veya vazokonstrüksiyon (lokal O ₂ konsantrasyonuna bağlı)
CBS sistationin beta sentetaz; cGMP siklik guanozin mono fosfotaz; CSE sistationin gama liyaz; ERK hücre dışı sinyal düzenleyici enzim; H ₂ S hidrojen sülfat; KATP ATP bağımlı potasyum kanalları; NMMA n-monometil L-arginin; NOS nitrik oksit sentetaz; PARP poli(ADP-riboz) polimeraz; sGC çözünür guanilil siklaz			

2.4.2. Hidrojen Sülfürün Üretimi

Memeli dokularında iki pridoksal-5 fosfat (PLP) bağımlı enzim, sistasyonin – β - sentaz (CBS) ve sistasyonin – γ - liyaz, H_2S 'in büyük çoğunluğunun L-sisteinden (Cys) sentezinden sorumlu iki enzimdir. Figür 1'de görüldüğü gibi Cys'in desülfürasyonu ile salınır. Önce Cys, CBS tarafından H_2S ve serin oluşturmak üzere hidrolize edilir ve yan ürün olarak ortaya çıkar veya CSE tarafında hidrolize edilerek H_2S , pruvat ve amonyak oluşur. İkinci olarak iki sistein molekülü CSE ile tiyosistein, pruvat ve amonyaka dönüştürülür, daha sonra tiyosistein CSE aracılığıyla Cys ve H_2S 'e dönüştürülür. Bunlar dışında da H_2S oluşturan minör yollar tanımlanmıştır (Şekil 1) ⁹. Ancak sonuç olarak memelilerde H_2S 'i oluşturan CSE veya CBS'nin sistein üzerindeki reaksiyonlarıdır.

CBS ve CSE doku dağılımları bakımından farklılık göstermektedir. Kardiyovasküler sistemde CSE ekspresyonu fazlayken, santral sinir sisteminde CBS ekspresyonu çok daha belirgindir ^{9, 17}. Rat beyinde (hipokampus, serebellum, serebral korteks, beyin sapı) CBS'nin transkripsiyonel ekspresyonu Northern blot analizi ile gösterilebilmiştir ^{9, 18}. Ayrıca D,L- propargilglisin (PAG=PPG) ve β -siyano-L-alanin (CNA) gibi yüksek afiniteli CSE inhibitörlerinin beyinde H_2S oluşumunu inhibe etmedikleri gösterilmiştir ¹⁸. Daha yeni olarak PPG VE CNA'nın rat beyin homojenatlarında sadece yüksek konsantrasyonlarda H_2S üretimini inhibe edebildikleri gösterilmiştir ¹⁹. Mikroglial hücre kültürlerinde de CSE ekspresyonu düşük bulunmuştur ²⁰.



Şekil 1:A) CBS ve CSE'nin sülfür metabolizmasındaki rolü: CBS (Vit B6) homosistein ve serin ile etkileşime girerek sistationin ve hidrojen sülfür oluşumunu sağlar. CSE sistationini hidrojen sülfür ile hidrolize ederek sistein α-ketobiturat ve amonyak oluşumunu sağlar. **B)** H₂S oluşumunda CBS ve CSE'nin etki mekanizması: CBS sistein (Cy-SH) ve tiyol varyasyonlarını (R-SH) katalize ederek H₂S ve etere karşılık gelen tiyol türü oluşumunu sağlar. CSE disülfid bağı ile iki sisteini (Cy-S-S-Cy), tiyol varyasyonları (R-SH) katalize ederek, piruvat amonyok disülfid varyanları (R-S-S-Cy) ve H₂S'in açığa çıkmasına neden olur²¹

Beyinde CBS Aracılığıyla Hidrojen Sülfür Üretimi

Santral sinir sisteminde H₂S varlığı, Warencyia ve ark. tarafından gösterilmiştir. H₂S sentezini sağlayan CBS aktivitesi değişkendir ve dokuya spesifiktir^{9, 22}. Beyin homojenatlarında Cys'ten H₂S üretimi, hidroksilamin (HA) ve aminooksiasetat (AOAA) gibi CBS inhibitörlerinin varlığı ile güçlü bir şekilde inhibe edilir^{9, 18}. Bu ajanlar selektif inhibitörler değildirler. CBS, astrositlerde ve mikroglia hücrelerinde bulunur. CSE ise asıl olarak kardiyovasküler sistemde bulunmakla beraber mikroglia da

eksprese olur²⁰. Astrositler, mikrogliaya göre 7-9 kat fazla H₂S sentezler^{23, 24}.

Dokularda sentezi ile ilgili iki ihtimal vardır. Birincisi enzimlerce üretildikten hemen sonra salınımıdır, ikincisi ise enzimlerce üretildikten sonra depolanmaları ve uyarı ile salınmalarıdır. İki tip sülfür deposu tespit edilmiştir. Asidik ortamda asit-labil formdaki salınır ve mitokondride bulunur. Bağlı sülfür ise sitoplazmada bulunur ve alkali ortamda salınır. Bu tip sülfürün ana kaynağı astrositlerdir²⁵.

Kanda çok düşük konsantrasyonlarda bulunması SSS'de sentezlendiğini gösteren önemli bir bulgudur²⁴.

S-adenozil-metyonin (SAM), H₂S'in allosterik regülatörüdür ve CBS aktivitesini iki kat arttırarak, H₂S sentezini hızlandırır¹⁸.

Beyinde hipokampal kesitlerde ve serebellumda H₂S yüksek miktarda bulunmaktadır¹⁸. Furne ve ark. SSS'de H₂S'in nanomolar veya düşük mikromolar konsantrasyonlarda (14 ± 3.0nM) olduğunu saptamışlardır¹⁴. CBS eksikliği, homosisteinüri ile kendini gösterir, plazmada homosistein ve metyonin yüksek, sistein ise düşük olarak saptanır²⁶. Mental retardasyon, iskelet anormallikleri ve tromboembolik ataklara eğilim vardır.

Hidrojen Sülfür Prekürsörleri

Metiyonin (Met), memelilerde esansiyel amino asittir ve tüm sülfür içeren amino asitlerin kaynağı olarak kabul edilir. Sistein (Cys) ise esansiyel değildir ve Met'ten homosistein (Hcy) aracılığıyla sentez edilir. Memeli karaciğeri serbest sistein havuzunu çok sıkı biçimde regüle eder. Bunu Cys rezervuarı olan glutatyon sentezi ile sağlar²⁷. Metiyonin ve homosistein gibi sistein de kan beyin bariyerini nötral amino asit taşıyıcı sistemi ile geçer²⁸.

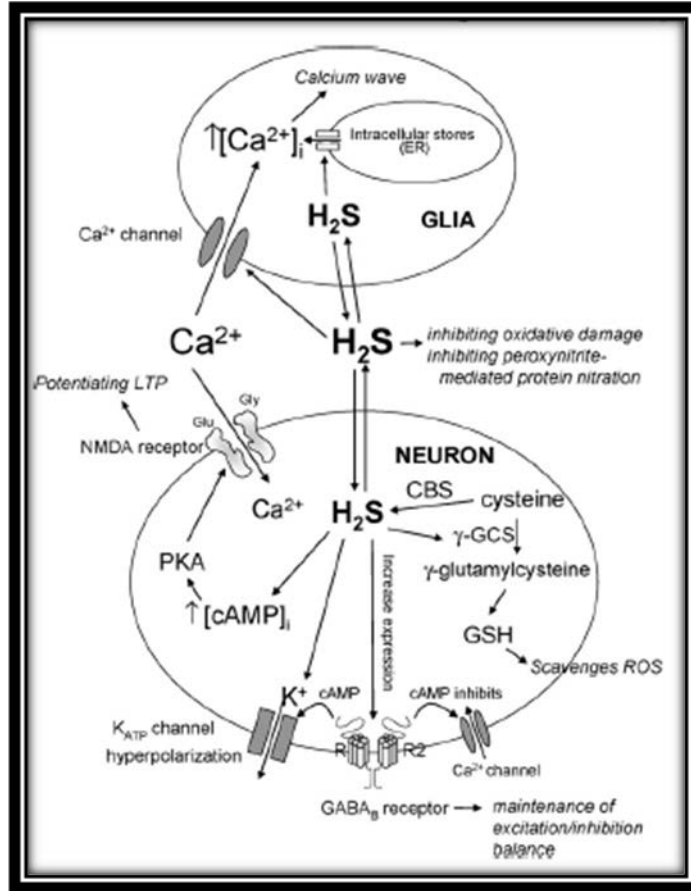
Homosistein ve sistein vasküler hastalıklarda ve SSS hastalıklarında giderek daha çok ilgi çeker hale gelmektedirler. Tüm nüfusta plazma seviyeleri yaşla değişkenlik göstermektedir ⁹. Plazma toplam Hcy ve Cys düzeylerinin koroner aterosklerozla ilişkili olduğu saptanmıştır ^{9, 29}.

Hidrojen Sülfürün Metabolik Sonu

Metiyonin'in sülfürü serine transfer edilir ve sistein oluşur. Sistein katabolizmasının son ürünleri sulfat (idrarla atılan sulfatın %77-92'si), ester sulfat (%7-9) ve taurin (%2-6)'dır. Ana metabolik yolakta oksidasyonla tiyosulfat, sulfit, sulfat ortaya çıkar. Eksojen H₂S uygulananlarda üriner tiyosulfat konsantrasyonlarında artış saptanmıştır ³⁰.

2.4.3. Hidrojen Sülfürün Santral Sinir Sisteminde Etkileri

Hidrojen sülfürün santral sinir sistemindeki etki mekanizmaları Şekil 2’de özetlenmektedir ⁹.



Şekil 2: H₂S'in merkezi sinir sisteminde olası etki mekanizması (CBS: sistationin β -sentaz, ER: endoplazmik retikülüm, γ -GCS: gama glutamilsistein sentetaz, LTP: uzun dönem potansiyel , PKA: cAMP bağımlı protein kinaz, ROS: reaktif oksijen metabolitleri ⁹

2.4.3.1 Nöronlar

Fizyolojik düzeylerde H₂S'in öncelikle NMDA reseptörlerini seçici biçimde uyardığı gösterilmiştir. Bu uyarım, hipokampal long-term potentiation (LTP)'nin indüksiyonunu sadece düşük tetanik uyarım varlığında kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla H₂S, sadece aktif snapslarda kolaylaştırıcı etkiye sahiptir¹⁸ ama bunun mekanizması bilinmemektedir.

Hücre içinde H₂S, NMDA reseptör aracılı yanıtları, cAMP üretimi ile kolaylaştırır. Eksojen H₂S rat serebrum ve serebellum nöronlarının primer kültürlerinde cAMP'yi arttırmaktadır³¹.

Han ve ark, H₂S'in pre ve post snaptik alanlarda GABA-B (γ-amino butirik asit) reseptörlerini upregüle ettiğini göstermişlerdir³². Bu gibi etkiler H₂S'in beyinde eksitasyon ve inhibisyon dengesinde rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir.

Nöromodulator etkinliğe ek olarak, H₂S'in nöronları hücre içi ve hücre dışında oksidatif stresten koruduğu gösterilmiştir⁹. Redükte glutatyonun beyinde önemli bir anti-oksidatif savunma olduğu bilinmektedir. Ayrıca H₂S, in vitro ortamda birçok hücrede H₂O₂'yi de etkisiz hale getirir³³. H₂S redükte glutatyon üretimini arttırmaktadır³⁴.

2.4.3.2. Glia

Hidrojen sülfür, glia hücrelerinde önemli bir nöromodulatördür. Eksojen H₂S, astrosit kültürlerinde ve hipokampal kesitlerde Ca⁺⁺ akımları oluşturmaktadır³⁵. Bu Ca⁺⁺ akımları H₂S tarafından tetiklenir ve hücre içi Ca⁺⁺ konsantrasyonunda artış olmasıyla da şiddetlenir. Beyin kesitlerinde H₂S tarafından oluşturulan bu Ca⁺⁺ artışı komşu astrositlere yayılır ve Ca⁺⁺ dalgası başlatır^{9, 35}.

Hidrojen sülfürün mikroglia da hücre içi Ca^{++} 'u doz bağımlı olarak, geri dönüşümlü arttırdığı bulunmuştur ²⁰. Endojen H_2S sentez inhibisyonunun hücre içi Ca^{++} 'u anlamlı biçimde azalttığı gösterilmiştir. H_2S , birçok hücre içi ve hücre dışı olayda önemli rol oynayan Ca^{++} dengesinde etkili olarak da fizyolojik olaylara katkıda bulunur.

Nöroinflamasyon, sinir sisteminde doğrudan hasar sonrası oluşan pro-inflamatuar sitokinlerle ortaya çıkan bir olaydır. Nöral ve bağışıklık sistemi arası etkileşimi, aktif immun hücreler, glia hücreleri ve nöronları içerir. Aktif mikroglia hücreleri nitrik oksid, tümör nekrosis faktör- α (TNF- α), interleokin 1β (IL- 1β) gibi pro-inflamatuar mediyatörler üretir ve salgılar. Bu mediyatörler doku hasarını artırır ve hücre ölümüne neden olur ³⁶. Hu ve ark, H_2S 'in lipopolisakkaridle indüklenen nitrik oksid ve TNF- α salınımını zayıflatarak, mikroglia ve astrositleri inflamasyondan koruduğunu göstermişlerdir ³⁷.

2.4.3.3. Hidrojen Sülfürün Santral Sinir Sisteminde Hücre İçi Sinyal Yolaklarına Etkisi

Hidrojen Sülfürün Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP)/Protein Kinaz A (PKA) Yolağına Etkisi

Birçok nörotransmitterin reseptörü (Dopamin D1/D5, β Adrenoseptör gibi), G_s protein aracılığıyla adenil siklaz (AC) aktivitesiyle eşleşmiştir. Adenil siklaz aktivitesi ile cAMP üretimi PKA'yı aktive eder ve bu yolla birçok protein fosforile edilerek beyin fonksiyonu düzenlenir. Serebral korteks ve serebellar korteks nöron ve glia hücrelerinin primer kültürlerinde H_2S donörü olan NaHS uygulandığında doz bağımlı olarak cAMP üretimini arttırdığı gösterilmiştir ³¹. H_2S 'in bu sayede hücre içi cAMP düzeyini regüle ederek NMDA reseptörü ve LTP üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. H_2S mikroglialarda Ca^{++} düzeyini arttırmaktadır ve bu etki PKA inhibisyonu ile zayıflatılır. Mikroglialarda H_2S 'in cAMP/PKA yolağını uyarıcı etkisi olabilir ²⁰.

Hidrojen Sülfürün Tirozin ve Mitojen Kinazlar Üzerine Etkisi

Reseptör tirozin kinazlar geniş bir hücre yüzey reseptör ailesidir. İntrinsik tirozin kinaz aktiviteleri vardır. Bu sayede hücre proliferasyonu, farklılaşması ve yaşamının sürdürülmesinde rol oynarlar ³⁸. Reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörü genistein ve tyrphostin A23'ün H₂S'in redüktif aktivitesini bloke ettiği gösterilmiştir ³⁹. Bu nedenle RTK aktivitesi aracılığıyla H₂S'in redüktif aktivitesinin güçlendiği ve oksidatif strese karşı nöroprotektif özellik taşıdığı düşünülmektedir.

NMDA aktivitesini Epidermal Growth Faktörün arttırmasına benzer biçimde, H₂S'in EGFR'yi uyardığı saptanmıştır ⁴⁰.

Mitojen Aktive Protein Kinazlar (MAPK), geniş bir kinaz ailesidir. Hu ve ark., 2007 yılında H₂S'in LPS ile indüklenen NO üretimini p38-MAPK inhibisyonu ile gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir ⁴¹. Bu bulgu H₂S'in tedavi ve/veya nöroproteksiyon bakımından serebral iskemi ve nöroinflamasyonda potansiyel bir ajan olduğunu göstermektedir.

Ekstraselüler Sinyal İlişki Kinazlar (ERK), tipik olarak büyüme ilişkili sinyallerle uyarılı ve uzun süreli nöronal plastisitede (LTP ve belleğin kalıcılığı) yer alırlar ⁴². Ancak H₂S'in ERK'ler üzerine etkileri daha detaylı incelenmelidir.

Hidrojen Sülfürün Glutatyon ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Glutatyon (γ - glutamilsisteinil glisin, GSH), sistein, glutamat ve glisin içeren bir tripeptiddir. Tek başına veya redükte haliyle GSH biçiminde bulunur. Beyinde homojen dağılmamıştır, nöronlarda az, astrositlerde fazla bulunur ²⁴. Bu nedenle beyinde GSH'in ana kaynağının astrositler olduğu düşünülür. Redüktan bir ajan olarak GSH, reaktif oksijen

radikallerine karşı (ROS) koruma sağlar ve birçok eksojen maddeye karşı da detoksifikasyon fonksiyonu görür ⁴³.

İmmatur kortikal nöronlar kullanılarak yapılan çalışmaya dayanarak H₂S'in GSH seviyelerini arttırdığı düşünülmektedir ³⁴.

H₂S'in GSH üzerine etkisiyle ilgili bir başka önemli mekanizma da glutamat alımının güçlendirilmesidir ⁴⁴. H₂S'in hidrojen peroksitle indüklenen hücresel hasarları geri döndürdüğü ve bu etkinin glutamat alım inhibitörlerince zayıflatıldığı gösterilmiştir.

Hidrojen Sülfürün İyon Kanalları Üzerine Etkileri

I. Kalsiyum Kanalları

Hücre içi kalsiyum, nöron içi ve nöronlar arası normal ve patolojik sinyalleşmede merkezi rol oynar. H₂S'in nöron, astrosit ve mikroglia da Ca⁺⁺ artışı yaptığı bulunmuştur. Ca⁺⁺'un düzenlediği fonksiyonlar düşünüldüğünde H₂S'in tüm bu olaylara dolaylı olarak katkıda bulunduğu iddia edilebilir ²⁴.

H₂S'in rat serebellar granuler nöronlarında nöronal ölüm ve hücre içi Ca⁺⁺ artışına neden olduğu, L-Tipi Ca⁺⁺ kanallarını bloke eden nifedipin veya nimodipinle bu etkinin ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu nedenle de H₂S'in L-Tipi kanallardan etkili olduğu düşünülmüştür ⁴⁵. Astrositlerde H₂S'in neden olduğu Ca⁺⁺ dalgası nifedipinle durdurulmuştur ³⁵.

Patch-clamp çalışmaları farklılaşmamış NG108-15 hücrelerinde NaHS'in T-Tipi Ca⁺⁺ kanallarından akımını arttırdığını göstermektedir ki, bu bulgu da H₂S'in Ca⁺⁺ kanallarını aktive ettiği tezini desteklemektedir ⁴⁶. Ayrıca intratekal ve intraplantar NaHS enjeksiyonunun ratlarda T-Tipi kanallar aracılığıyla hiperaljeziyi indüklediğini bildirilmiştir ^{46, 47}. Daha sonraki çalışmalarda H₂S'in Ca_v3.2

izoformundaki T-Tipi kanalları aktive ettiği, bu kanalları bloke eden mifebradil ve $ZnCl_2$ ile hiperaljzezinin kaybolduğu gösterilmiştir ⁴⁷.

H_2S 'in indüklediği Ca^{++} dalgasının, non-spesifik Ca^{++} kanal inhibitörleri gadolinium ve flunarizin ile bloke edilebilmesi de H_2S 'in Ca^{++} üzerindeki etkisini desteklemektedir ³⁵.

H_2S 'in voltaj duyarlı Ca^{++} kanallarını inhibe ederek damar düz kasında gevşeme oluşturduğu hipotezini araştıran bir çalışmada rat serebral arterlerindeki bulguların bu hipotezi desteklediği bulunmuştur. Ayrıca rat serebral arterlerinde CSE ekspresyonu saptanmıştır ⁴⁸.

II. Potasyum Kanalları

Spesifik K^+ blokörü gliklazid ve apamin kullanıldığında, H_2S 'in fizyolojik konsantrasyonlarda hipotalamus ve dorsal raphe serotonerjik nöronlarda K_{ATP} ve K_{Ca2+} kanallarını aktive ettiği saptanmıştır ^{49, 50}. Dawe ve ark. posterior hipotalamusa NaHS enjekte edildiğinde kan basıncının düştüğünü ve bu etkinin K_{ATP} kanal inhibitörleri ile kaybolduğunu saptamışlardı ⁴⁹. K_{ATP} kanallarının nöbet kontrolünde rol oynadığı, hipokside presnaptik nöronlardan nörotransmitter salınımıyla nöroproteksiyon yaptığı bildirilmiştir. Dolayısıyla H_2S 'in nöroprotektif etkinliğini sağlayan bir diğer mekanizma da K^+ kanalları olabilir ⁵¹.

H_2S 'in damar düz kasında K^+ kanalları aracılığıyla hiperpolarizasyon, dolayısıyla vazodilatasyon yapması nedeniyle NO'nun EDRF biçiminde tanımlanmasına atıf yapar şekilde 'Endotel Derived Hiperpolarizing Factor (EDHF) olarak da tanımlanmıştır ⁵².

III. Klor Kanalları

H_2S 'in oksitosis sırasında HT22 hücre serisinde CFTR Cl^- kanallarını aktive ederek nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir ⁵³. H_2S 'in düz kas hücrelerinde Cl^-/HCO_3^- taşıyıcılarını aktive ettiği gösterilmiştir. Bu

bulgu SSS'de klor akımlarıyla nöroprotektif olaylarda H₂S'in etkili olabileceğini düşündürmektedir⁵⁴.

Hidrojen Sülfürün Amino Asit Nörotransmitterler Üzerine Etkisi

I. GABA Aracılı Nörotransmisyon

GABA, SSS'nin major inhibitör nörotransmitteridir ve memeli beyinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. H₂S'in febril nöbetler nedeniyle GABA_BR1 ve GABA_AR1 kaybıyla oluşan hipokampal hasarı azalttığı bildirilmiştir^{24, 32}. Bu azalmada, H₂S'in neden olduğu Ca⁺⁺ bağımlı transkripsiyonun mRNA ve bu GABA reseptörlerinin protein düzeylerini yükselterek etkili olduğu düşünülmektedir²⁴.

II. Glutamat Aracılı Nörotransmisyon

Glutamat, öğrenme ve bellek, LTP indüksiyonu, ağrı, eksitatuvar nöral hasar gibi olaylarda önemli rol oynar. Her ne kadar H₂S'in NMDA reseptörleri üzerinde agonist aktivite gösterdiğini ispatlayan net bir kanıt olmasa da, mevcut bulgular H₂S'in NMDA reseptör regülasyonu ile fizyolojik veya patolojik fonksiyonları sağladığını desteklemektedir. Bu etki temelde H₂S'in cAMP/PKA yolağını indüklemesiyle oluşur³¹. NMDA reseptör blokörlerinin nöronlarda H₂S'in indüklediği hücre ölümünü inhibe ettiği, ratlarda inme modelinde infarkt hacmini azalttığı bildirilmiştir⁵⁵. Özetle, H₂S'in indüklediği NMDA sinyal sistemi eksitasyonu arttırabilir ve nöronların yaşam/ölüm dengesinde rol oynayabilir.

Bu tip çalışmalardaki en önemli eleştirisi H₂S'in çok yüksek dozlarının kullanılması, normalde çok hızlı ortamdan kaybolması nedeniyle sürekli uygulama yapılmasının fizyolojik olmamasıdır. NMDA reseptör aktivasyonu sağlayan dozlar toksik düzeylere ulaşmaktadır²⁴. Şekil 3 'de H₂S'in glutamaterjik nöronlardaki etki mekanizması görülmektedir⁵⁶.

Hidrojen sülfürün santral sinir sisteminde rol oynadığı sinyal iletim yolları Tablo 2’ de özetlenmiştir ²⁴.

Tablo 2: Merkezi sinir sisteminde hidrojen sülfat tarafından indüklenen önemli sinyal iletimleri ²⁴

Protein/reseptör/ nörotransmitter	Etki	Hücre Tipi	Referans
Protein Kinaz A	PKA stimülasyonu / cAMP artışı	Nöronlar ve hücre dizileri (B12 B49 B50 B103 ve B104) mikroglia	Kimura (2000) Lee ve arkadaşları (2006)
Mitojen ve Tirozin kinaz reseptör	Aktivasyon baskılama uyarımı	Nöronlar astrositler ve hücre dizileri (Neuro2A-COS-7 NIH3T)	Umemura ve Kimura (2007)
	P38-MAPK inhibisyonu	Mikroglialar ve hücre dizisi (BV-2)	Hu ve arkadaşları (2007b)
Oksidatif stres	Peroksinitrit sitotoksitesi baskılama	Hücre dizisi (SH-SY5Y)	Whiteman ve arkadaşları (2004)
	Oksidatif sitotoksite inhibisyonu	Nöronlar astrositler ve hücre dizileri (Neuro2A-COS-7 NIH3T)	Umemura ve Kimura (2007) Kimura(2004)
	H ₂ O ₂ sitotoksitesi baskılama	Nöronlar Astrositler	Lu ve arkadaşları (2008)
	Hücre glutatyonunu artırma		Kimura (2004)
	Glutatyon alımını artırma	Nöronlar Nöronlar	Kimura (2004)
Kalsiyum kanalları	L tipi kanal aktivasyonu	Nöronlar Astrositler Hücre dizisi(NG108-	Garcia-Bereguain ve ark (2008) Nagai ve ark (2004) Kawabata ve ark

	T tipi kanal aktivasyonu	15)	(2007)
	Hücre içi kalsiyum taşınması	Mikroglia	Lee ve ark (2006)
		Astrositler	Nagai ve ark (2004)
Potasyum kanalları	KATP kanal aktivasyonu	Nöronlar (in vivo)	Dawe ve ark (2008)
	KCa ² kanal aktivasyonu	Nöronlar	Kombian ve ark (1993)
Klor kanalları	CTFR knal aktivasyonu	Hücre dizisi (HT22)	Kimura ve ark (2004)
GABA	Ağrılı uyarın kaybına bağılı olarak GABA inhibisyonu	Nöronlar	Han ve ark (2006)
Glutamat	NMDA potensiyalizasyonu	Nöronlar (invivo)	Abe ve Kimura (1996)
	Glutamat salınımı	Nöronlar	Garcia-Bereguaiin ve ark (2008)
Katekolaminler	Monoamin oksidaz inhibisyonu	Nöronlar	Warenycia ve ark(1989b)

GABA, Gamma amino butirik asit; cAMP, siklik adenozin monofosfat; MAPK, mitojen aktifenmiş protein kinaz; NMDA, n-metil-a-aspartik asit; CTFR, kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyicisi

Vazodilatatör Etkinlik

İn vivo ve in vitro olarak muhtemelen damar düz kasındaki K_{ATP} kanallarını açarak, güçlü vazo-dilatasyon yapması nedeniyle H₂S son yıllarda giderek artan biçimde önem kazanmaktadır.

Bu alandaki ilk çalışmada in vitro olarak rat aortik dokusunda H₂S saptanmıştır^{57, 58}. Daha sonraki bir çalışmada H₂S'in bolus enjeksiyonu ile ratlarda geçici kan basıncı düşüklüğü saptanmıştır. Bu etki pinasidile (K_{ATP} kanal açıcısı) benzer ve glibenklamid (K_{ATP} kanal blokörü) ile inhibe edilmektedir⁵⁹. Ayrıca bu çalışma, endotel çıkartıldığında vazo-dilatatör etkinin zayıfladığını göstermektedir ki, bu bulgu H₂S'in endotel

kaynaklı vazodilatasyon yapan faktörler üzerinden etkili olduğunu göstermektedir. H₂S, NO veya CO gibi cGMP yolağından bağımsız aktivasyon göstermektedir çünkü cGMP inhibitörleri H₂S'in etkinliğini değıştirmemektedir⁵⁹.

Hayvan alışmalarında H₂S'in kardiyovasküler sistemdeki etkileri incelenmiştir. CSE inhibitörü (L-NAME) uygulanan ratlarda hipertansiyon saptanmıştır⁶⁰. Aynı deneklere NaHS uygulandığında hipertansiyon gerilemiştir.

Sepsis ve endotoksik řokta arteriel H₂S düzeyleri yüksek bulunmuřtur ve endojen H₂S'in řok mekanizmaları içinde yer aldıėı dűřünűlmektedir⁶¹.

2004 yılında yapılmış bir çalışmada ratlarda spontan hipertansiyonda H₂S'in rolű araştırılmış ve bu ratların torasik aortlarında CSE aktivitesi dűřük bulunmuřtur⁶². Bu hayvanlara eksojen H₂S uygulanmasıyla hem hipertansiyon önlenmiş hem de damarlarda yapısal dűzelmeler saptanmıştır.

Li ve ark. ratların torasik aortunda yaptığı çalışmada H₂S'in doz bağımlı olarak aortta dilatasyona yol açtığı, bu etkinin dűřük dozda endotel bağımlı, yüksek dozlarda ise endotel bağımsız olduğu, vazodilatatör etkinliğin nörotransmitterlerden, oksijen radikallerinden, prostoglandinden, PKC'den ve cAMP yolağından ilgisiz olduğunu saptamışlardır. Diėer çalışmaların aksine bu etkilerin cGMP bağımlı olduğunu iddia etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada NO ve H₂S'in sinerjistik etkiyle vazodilatasyon yaptığı gösterilmiřtir⁶³. Bařka çalışmalarda ise NaHS ile beraber NO donörü uygulandığında, NO'nun vazodilatatör etkinliğinin kaybolduğu iddia edilmektedir^{63,64}.

H₂S'in damar düz kas hücrelerine Ca⁺⁺ akımı yaratması sonucunda NO salınması ile vazodilatasyona neden olduğu da, öne sürülen bir başka mekanizmadır^{63, 65, 66}.

H₂S, NO ve Ca⁺⁺ ilişkisini araştıran yeni bir çalışmada H₂S'in doz bağımlı olarak endotel kaynaklı NO'yu arttırdığı saptanmıştır. Bunu da Ca⁺⁺ bağımlı endotel nitrik oksid sentaz aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir⁶⁷.

Martelli ve ark.'nın 2013 yılındaki çalışmasında NaHS'in neden olduğu vazodilatasyon Kv7 kanal inhibitörleri ile geri döndürülmüştür. Bu çalışmayla diğer K⁺ kanallarının da H₂S'in etki mekanizması içinde yer alabileceği düşüncesi doğmuştur⁶⁸.

H₂S'in vazodilatatör etkinliğinde transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ve vanilloid 1 (TRPV1)'in rolü olup olmadığını araştıran çalışmada H₂S'in etkilerinde TRPA1 aktivasyonunun rolü olduğu, TRPV1' in ise etkisinin olmadığı gösterilmiştir⁶⁹.

Tavşan periferel arterlerinde oluşturulan stenoza yönelik balon anjioplasti uygulaması sonrası NaHS uygulandığında restenoz oranı anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu çalışmada H₂S'in neointimal hiperplaziyi önlediği ve H₂S inhibitörü PPG'nin düz kas proliferasyonu yaptığı saptanmıştır⁷⁰.

Şekil 4'de hidrojen sülfürün vazodilatasyon oluşturma mekanizmaları gösterilmektedir⁵⁶.

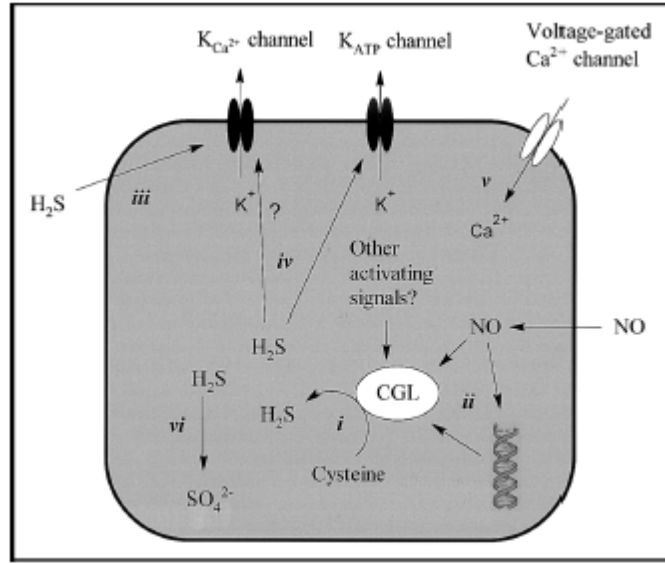


Figure 2. A model outlining the mechanisms controlling H₂S biosynthesis and H₂S-mediated relaxation in smooth muscle cells.

Şekil 4: H₂S'in düz kas hücrelerindeki üretim kontrol mekanizması ve kas gevşetici özelliğinin modeli. Bazı düz kas hücrelerinde (örn: aorta) H₂S üretimi sistationin gama liyaz (CGL) üzerinden olmaktadır. CGL transkripsiyonu ve aktivasyonunda endotel kökenli nitrik oksidin etkin olduğu düşünülse de kesin bilgi günümüzde maalesef elde edilememiştir. (NO: ii). CGL ve çevre doku (iii) tarafından hücre içi düzeyi artırılan H₂S kalsiyum bağımlı potasyum kanallarını ve veya ATP bağımlı potasyum kanallarını (KATP; iv) tam bilinmeyen bir mekanizma ile açarak hücre içi potasyumunun hücre dışına atılmasını sağlar. Buna rağmen hiperpolarizasyon ardına gelen düz kas gevşemesidir. Ayrıca negatif membran potansiyeli, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını kapatarak hücre içi kalsiyum azalmasına yardımcı olur. (v). Nöronal hücrelerde H₂S inaktivasyonunun kimyasal/enzimatik sülfat oksidasyonu mekanizması ile yapıldığı tahmin ediliyor (vi) ⁵⁶.

2.4.4. Santral Sinir Sistemi Hastalıklarında Hidrojen Sülfürün Rolü

İskemik İnme

Sisteinin infant farelerde nöronal ölüme neden olduğu, rat hipokampal kesitlerinde nöronlar için toksik olduğu gösterilmiştir ^{71, 72, 73}. Karotis arter ligasyonu uygulanan hayvanlarda hücre dışı sistein düzeylerinde anlamlı yükselme gözlenmiştir ⁷⁴. Dolayısıyla beyin iskemisinde hücre dışı sistein yüksekliğinin patofizyolojik olaylarda rolü olabileceği düşünülmektedir. Sistein, NMDA reseptör agonisti olmamakla beraber, neden olduğu nöronal ölüm NMDA antagonistlerince önlenebilmektedir ⁷¹. Sisteinin OSA oklüzyonu sonrası infarkt hacmini artırıyor olması ve bu etkinin CBS inhibitörü AOAA ile kayboluyor olması iskemik olaylarda beyinde H₂S'in rolünü desteklemektedir ⁷⁵. Qu ve ark.'nın çalışmasında OSA oklüzyonu uygulanan ratlarda NaHS uygulandığında infarkt hacminde artış görülmüştür. Bu deneklere NMDA antagonisti verildiğinde ise infarkt hacminde artış etkisi kaybolmaktadır. OSA oklüzyonun serebral kortekste H₂S'i arttırdığı tespit edilmiştir ⁷¹.

Ren ve ark.'nın iki karotis arter ve iki vertebral arteri oklude ettikleri global serebral iskemi modelinde hipokampus, korteks ve plazmada H₂S sentezleyen enzim aktivitelerine, CBS mRNA ekspresyonuna ve CBS proteinine 12, 24, 48,72. saatler ve 1. haftada bakmışlardır. Ayrıca bir grup rata da NaHS ile preconditioning yapılmıştır. Serebral iskemi sonrası reperfüzyon uygulandıktan 12 saat sonra hipokampusta H₂S anlamlı biçimde yükselmiş, 24 saat sonra anlamlı biçimde azalmış ve ilerleyen zamanda aynı düzeyde kalmıştır. Kortekste de benzer sonuçlar alınmıştır. CBS sentezleyen enzim düzeyleri de bu sonuçlara paralellik göstermektedir. İskemi öncesi NaHS uygulanan deneklerde doz bağımlı olarak nöral hasar gerilemiştir ⁷⁶. Shao ve ark.

2006 yılındaki çalışmalarında beyin iskemisinden sonra reperfüzyonun 6. saatinden sonra H₂S'in yükseldiğini göstermişlerdir ⁷⁷.

Beyin iskemisini takiben glutamat ve superoksidin yükseldiği iyi bilinmektedir ⁷⁸. Ayrıca bu artmış glutamat ve superoksid beyin iskemisinin erken reperfüzyon döneminde vazodilatasyonu indüklerler ⁷⁹. ⁸⁰. Bu artmış kan akımının bir yere kadar beyni koruduğu düşünülür.

H₂S'in damar düz kasında gevşeme yapması ve pulmoner arterlerde dilatasyona yol açması serebral etkilerinin de merak edilmesine neden olmuştur ⁸¹. Tang ve ark. 2005 yılında vazodilatasyonu K_{ATP} kanallarını açarak yaptığını göstermişlerdir ⁸².

Geçici global serebral iske mi sonrası reperfüzyon sırasında asıl hücre ölüm biçimi apoptozdur ⁸³. Birçok in vitro ve in vivo çalışmada H₂S'in apoptozu engellediği gösterilmiştir ^{84, 85, 86, 87}.

Zhang ve ark. 2009 yılında geçici serebral iske mi reperfüzyonda H₂S'in apoptozu önleyerek nöronal korunma sağladığını tespit etmişlerdir ⁸⁸.

Wong ve ark (2006), intravenöz veya intraperitoneal Cys uygulamasının, doz bağımlı olarak, orta serebral arter (OSA) oklüzyon modelinde ratlarda infarkt alanını genişlettiğini göstermişlerdir. AOAA uygulandığında ise bu etkinin zayıflaması, Cys'den H₂S oluşumunun azaltılmasıyla açıklanmaktadır. H₂S donörü olan NaHS uygulandığında infarkt alanında genişleme olması ve bunun MK-801 ile tersine döndürülebilmesi de yine H₂S'in inmedeki etkisini desteklemektedir ⁷⁵. Bu nedenle inme tedavisinde H₂S düzeyinin kontrolünün yeri olabilir. Ayrıca inme sırasında Cys yüksekliği ile kötü prognoz arası ilişkiyi destekleyen çalışmalar da bulunmaktadır ⁷⁵.

Homosistein yüksekliği ile inme arası ilişkiyi destekleyen çalışmalar olmakla beraber nüfusa dayalı cohort çalışmalarda homosistein yüksekliği ile iskemik inme arası ilişki saptanmamıştır^{89, 90, 91, 92}.

Alzheimer Hastalığı

NO ve CO'nun hipokampal LTP'de retrograd mesajcı gibi fonksiyon görerek öğrenme ve bellekte rol aldığı bilinmektedir⁵⁸. Fizyolojik düzeylerde H₂S'in öncelikle NMDA reseptörlerini seçici biçimde uyardığı gösterilmiştir. Bu uyarım, hipokampal long-term potentiation (LTP)'nin indüksiyonunu sadece düşük tetanik uyarım varlığında kolaylaştırmaktadır. Bu bulgudan yola çıkılarak Alzheimer hastalığında H₂S'in seviyesinin düşüklüğünün rolü olabileceği dřnlmřtr⁹. Alzheimer hastalığında H₂S düzeyinin düşük olduğunu gösterir kanıt bulunmasa da CBS aktivitesini arttıran SAM düzeyi Alzheimer hastalarının beyinlerinde düşük bulunmuřtur⁹³. Mevcut bulgular ilişkiyi gcl biçimde desteklemekten uzaktır.

3. YÖNTEM VE GEREÇ

Bu alışma "Gazi Üniversitesi Deney hayvanları Etik Kurulu"ndan etik kurul onayı alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışma ncesinde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onam alınmıştır. Bu araştırma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından maddi olarak desteklenmiştir (Proje Kodu: 01/2011-64).

3.1. Hayvanların Hazırlığı

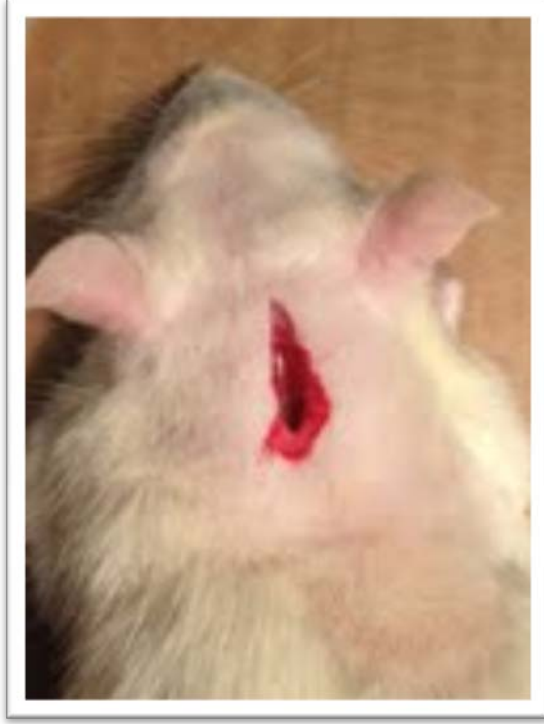
Bu çalışmada 48 adet Wistar cinsi, yetişkin, her iki cinsiyetten, daha önce hiçbir deneyde kullanılmamış, sağlıklı rat kullanılmıştır. Toplam sekiz gruptaki ratlar, 6'lı gruplar halinde tabanında 3-6 cm kalınlığında talaş bulunan sert zemine sahip şeffaf kafeslerde

tutuldu. Deneyin bir gece öncesinde ratlar aç bırakılmıştır. Deney süresince ratlar standart hayvan yemi ile beslenip yeterince su verildi. Baziler arter ve beyin sapı örneklerini inceleme işlemleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2. Cerrahi Prosedür

3.2.1. Deneysel Subaraknoid Kanama Oluşturulması

Sisterna magnaya otolog arteriel kan transfüzyonu ile deneysel serebral vazospazm modeli yöntem ve etkinlik bakımından genel kabul görmüş, standart tekniklerden biridir⁹⁴. Çalışmamızda da bu model kullanılmıştır. Genel anestezi altında oksiput ve C1 palpe edildikten sonra bölgeye saha temizliği yapıldı ve 2 cm'lik insizyonla cilt geçilerek, adale diseksiyonu yapıldı ve kraniovertebral bileşke ortaya konuldu. Enjektör ile sisterna magnaya ponksiyon yapıldı. 0.1cc BOS boşaltıldıktan sonra kalbin sol ventrikülünden alınan 0.2cc arteriyel kan sisterna magnaya yavaşca enjekte edilerek deneysel SAK oluşturuldu. Enjeksiyonu takiben denekler 45 derecelik Trendelenburg pozisyonunda 15 dakika bekletildi. Denekler 24. saatte sakrifiye edildi. Beyin sapı ve baziler arter numuneleri %10 luk formaldehit içinde +4 derecede muhafaza edildi.



Resim 1: Sisterna magna ponksiyonu için yapılan insizyon



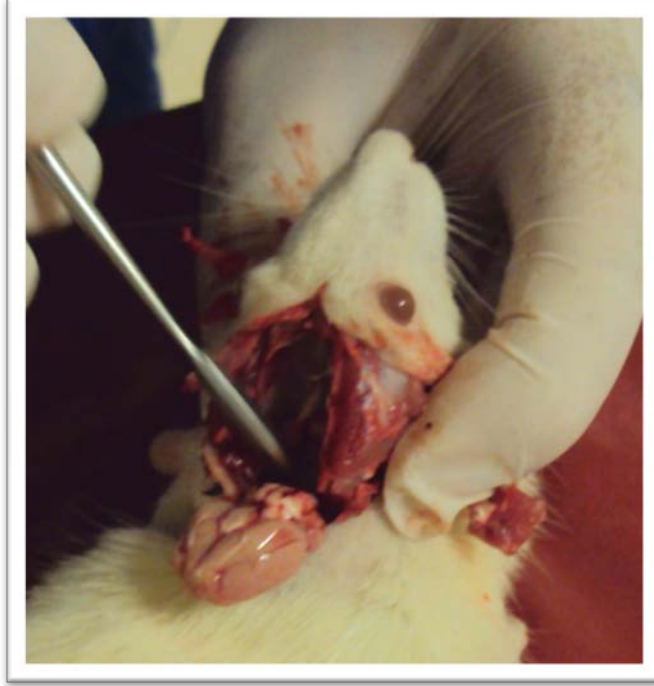
Resim 2: Sisterna magnaya otolog arteriel kan enjeksiyonu

3.2.2. Dekapitasyon ve Doku Örneklerinin Alınması

İntraperitoneal fenobarbital ile feda edilen deneklere dekapitasyon yapıldı. Skalp açılarak kalvaryum ortaya konuldu. Beyin ve beyin sapı bir bütün olarak zedelenmeden çıkartıldı. Daha sonra beyin sapı ve baziler arter bir bütün halinde çıkartılıp, beyin sapı ve baziler arter kesitleri alındı.



Resim 3: Dekapitasyon öncesi beyin sapı, serebellum ve serebrum



Resim 4: Dekapitasyon



Resim 5: Kontrol grubuna ait bir beyin sapı ve baziler arter örneği



Resim 6: SAK yapılmış bir deneğin beyin ve beyin sapı yapıları, anteriordan görünüm



Resim 7: SAK yapılmamış bir deneğin beyin ve beyin sapı, anteriordan görünüm

3.3. Deney Grupları

1. Gruptaki (Kontrol) denekler 100mgr/kg intraperitoneal fenobarbital (*Pentothal Sodyum, Abbott, İstanbul, Türkiye*) ile feda edilmiş, hemen sonra deneklerin baziler arter ve beyin sapı örnekleri alınmıştır.

2. Grupta (SAK) deneklere genel anestezi altında (60mg/kg IM Ketamine HCl (*Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye*) ve 5 mg/kg IM Xylazine (*Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye*)), kendi arteriyel kanları sisterna magna içine insülin enjektörü ile 0.2 cc enjekte edilecek ve deneysel subaraknoid kanama modeli oluşturulmuştur. 24 saat sonra, bu denekler 100mgr/kg intraperitoneal fenobarbital ile feda edilip, baziler arter ve beyin sapı örnekleri alınmıştır.

3. Gruptaki (NaHS) deneklere H₂S donorü olan NaHS (*Sodium hydrosulfide monohydrate. Ürün No:13590, Cas-No: 140650-84-6, Sigma-Aldrich*) 0.18mmol/kg intraperitoneal yolla verilmiş, 24 saat sonra denekler 100mgr/kg intraperitoneal fenobarbital ile feda edilecek, baziler arter ve beyin sapı örnekleri alınmıştır.

4. Gruptaki (PPG) denekler H₂S sentezleyen sistasyonin β sentaz (CBS) inhibitörü (propargylglycine) (*DL-Propargylglycine 1gr, P7888, SIGMA C-13408*) 100mgr/kg intraperitoneal yol ile verilmiş, 24 saat sonra denekler 100mgr/kg intraperitoneal fenobarbital ile feda edilip, baziler arter ve beyin sapı örnekleri alınmıştır.

5. Gruptaki (AOAA) deneklere H₂S sentezleyen sistasyonin γ liyaz (CSE) inhibitörü (aminooxyasetik asit) (*O-(Carboxymethyl) hydroxylamine hemihydrochloride %98 1gr, C13408, Sigma-Aldrich*) 0.05mmol/kg intraperitoneal yol ile verilmiş, 24 saat sonra denekler 100mgr/kg intraperitoneal fenobarbital ile feda edilip, baziler arter ve beyin sapı örnekleri alınmıştır.

6. Gruptaki (NaHS+SAK) genel anestezi altında (60mg/kg IM Ketamine HCl ve 5 mg/kg IM Xylazine), sisterna magnaya kendi arteriyel kanları enjekte edildikten sonra 0.18mmol/kg NaHS intraperitoneal yol ile uygulanıp, 24 saat sonra 100mgr/kg intraperitoneal fenobarbital ile feda edilip, baziler arter ve beyin sapı örnekleri alınmıştır.

7. Gruptaki (PPG+SAK) denekler, genel anestezi altında (60mg/kg IM Ketamine HCl ve 5 mg/kg IM Xylazine), sisterna magnaya kendi arteriyel kanları enjekte edildikten sonra CBS inhibitörü PPG 100mgr/kg intraperitoneal yolla uygulanıp, 24 saat sonra 100mgr/kg intraperitoneal fenobarbital ile feda edilmiş, baziler arter ve beyin sapı örnekleri alınmıştır.

8. Gruptaki (AOAA+SAK) denekler genel anestezi altında (60mg/kg IM Ketamine HCl ve 5 mg/kg IM Xylazine) sisterna magnaya kendi arteriyel kanları enjekte edildikten sonra CSE inhibitörü AOAA 0.05mmol/kg intraperitoneal yolla uygulanıp, 24 saat sonra 100mgr/kg intraperitoneal fenobarbital ile feda edilmiş, baziler arter ve beyin sapı örnekleri alınmıştır.

3.4. Histopatolojik Değerlendirme

3.4.1. Baziler Arter Lümen Çapı ve Duvar Kalınlığı Ölçümleri

Her hayvana ait beyin sapı örnekleri %10'luk formaldehitte 24 saat fiksasyona maruz bırakıldıktan sonra, parafine gömülmek üzere rutin doku takip işleminden geçirildi. Hazırlanan parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin-eosin (H&E) ile boyandı. Her bir numune için, baziler arter çapı ve duvar kalınlığı bilgisayarlı görüntü analiz sistemi ile ölçüldü. H&E boyalı kesitlerden, ışık mikroskopuna (Olympus BX51, Olympus Optical Co. Ltd) bağlı 3 CCD renkli video kamera (Olympus DP70, Olympus Optical Co. Ltf, Tokyo) ile X40' lık büyütme ile elde edilen dijital görüntülerde, görüntü analiz yazılımı ile

ölçümler yapıldı. Her olgu için, baziler arterin en geniş ve en dar izlenen segmentlerinin çap ölçümleri ile duvar kalınlığı 2 ayrı X40 lık büyük büyütme alanında ölçüldü. Her bir ölçüm sistemde otomatik olarak mikronmetre cinsinden kaydedildi.

3.4.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal boyama streptavidin-biyotin 3'lü indirect immüno-peroksidaz yöntemi kullanılarak yapıldı. 4 mikron kalınlığındaki kesitler 56C° liketüvde 12 saat tutularak deparafinize edildikten sonra yarım saat ksilolde bekletildi. Her birinde beşer dakika bekletilerek sırasıyla %100, %95 ve %90'lık alkollerden geçirilme yoluyla hidrasyonları sağlandı ve çeşme suyu ile yıkandı. Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojenperoksitte 10 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildikten sonra PBS tampon (pH:7.6) ile 5 dakika süresince yıkandı. 0.01M sodyum sitrat tamponu (pH:6.0) içinde toplam 5 dakika süre ile mikrodalga fırında işlemden geçirildi ve distile su ile 3 kez yıkandı. Kesitler 20 dakika süre ile non-immün protein bloklama serumunda bekletildi. Birincil (primer) antikolar (CTH monoclonal antibody (*CTH monoclonal antibody (M03), clone S51-M01 Catalog #: H00001491-M03 100ug*), CBS monoclonal antibody (*CBS monoclonal antibody (M01), clone 3E1, Catalog #: H00000875-M01 100ug*) kesitleri kapatacak şekilde uygulandı ve oda sıcaklığında 2 saat süre ile bekletildi. İki kez 5'er dakika PBS ile yıkandı ve kurulandı. Antikoların her ikisi de kullanılmadan önce 1:100 oranında PBS ile dilüe edildi. Kullanılan biyotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor (Multi-species Ultra streptavidin detection system-HRP; Signet, Massachusetts, USA), streptavidin- biyotin kompleksi (Signet) ve DAB (diaminobenzidin tetraklorid, Novocastra, Newcastle-upon-Tyn, UK), ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklindeydi. Zemin boyaması için çabuk boyama yöntemi ile hematoksilin ile boyandı. Dehidrasyon için kesitler sırasıyla %90, %95 ve %100'lük alkollerde beşer dakika tutuldu, ksilolde şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

Pozitif doku kontrolleri olarak CBS antikoru için insan hepatosellüler karsinomu, (CSE) CTH antikoru için insan pankreas parankimi kullanıldı. Her iki antikor için sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. Boyanma şiddeti kontrol grubu ile karşılaştırılmak kaydı ile subjektif olarak zayıftan şiddetliye doğru üç kategoride incelendi. Zayıf boyanma=(+), orta şiddette boyanma =(++), yoğun boyanma =(+++)) olarak değerlendirildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Parametrik olmayan data için, gruplar arasında her parametreyi karşılaştırma amacıyla Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalar için Dunn prosedürü, çoklu karşılaştırmalar için Benferroni düzeltmesi eklenmiştir.

İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Beyin sapı ve baziler arterde CBS ve CSE enzimlerinin ekspresyonunun analizinde, grup sayısı, gruplardaki denek sayısı ve ekspresyonun şiddetinin 4 derecede tanımlanması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı ifade edilebilecek güçte rakamlar oluşmadığından sadece yüzdelerle gösterilmiştir.

Tüm analizler SPSS istatistik paketi (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp) kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Tüm gruplardaki lümen çapı ve duvar kalınlığı değerleri Tablo 3'de gösterilmektedir.

Tablo 3: Tüm gruplara ait baziler arter lümen çapı ve duvar kalınlığı değerleri

		Grup								
		1	2	3	4	5	6	7	8	Toplam
Lümen Çapı (µm)	Ortalama	179,8295	84,2248	222,6654	161,5253	112,1374	194,3256	138,9724	137,2047	154,4197
	Std. Sapma	44,39934	9,31367	20,71559	26,73331	13,06369	39,23435	49,18511	33,41780	52,20975
	Medyan	180,0973	86,8968	223,6003	161,3433	110,4790	193,8258	136,6711	149,3520	154,5562
	Minimum	132,09	70,49	199,89	129,07	99,02	139,92	54,65	96,25	54,65
	Maksimum	246,32	94,45	244,07	190,61	126,10	243,13	198,08	166,58	246,32
Duvar Kalınlığı (µm)	Ortalama	30,3698	52,9479	29,9979	31,2581	31,7598	35,4840	34,2238	34,6549	35,1384
	Std. Sapma	6,10236	6,41127	5,23917	10,61451	5,00951	8,99730	6,96082	3,37012	9,56321
	Medyan	31,6714	53,6927	29,9808	32,3096	31,5766	37,5080	33,4924	34,6789	34,6789
	Minimum	22,25	42,50	24,42	17,82	26,23	20,38	24,12	30,05	17,82
	Maksimum	37,19	59,65	39,04	42,99	37,90	45,56	43,53	40,04	59,65

4.1. Baziler Arter Lümen Çapı

Tüm ratların baziler arterlerinde lümenin en dar ve en geniş değerlerinin ortalaması alınmak suretiyle ölçüm yapılmıştır. İstatistiksel analiz medyan değerler üzerinden yapılmıştır. Baziler arter lümen çapı ve duvar kalınlığı ölçümü Resim 8 ve 9'da görülmektedir.

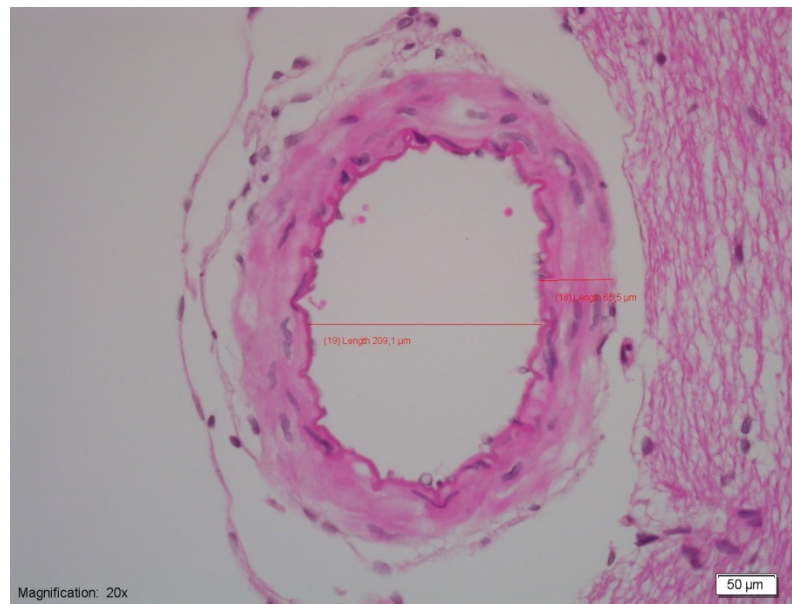
Kruskal Wallis analizine göre gruplar arasında lümen çapı ($\chi^2 (7) = 32.083, p < 0.001$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır.

Kontrol grubuna göre (1. Grup), SAK grubunda (2. Grup) istatistiksel olarak anlamlı biçimde lümen çapı dar bulunmuştur ($p = 0.027$).

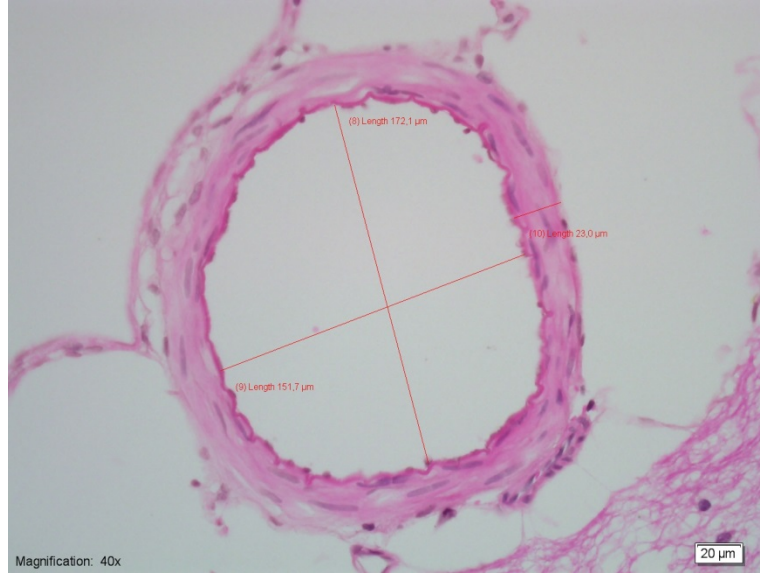
SAK grubuna (2. Grup), göre NaHS grubunda (3. Grup) istatistiksel olarak anlamlı biçimde lümen çapı geniş bulunmuştur ($P = 0.001$).

SAK grubuna (2. Grup), göre SAK+NaHS grubunda (6. Grup) istatistiksel olarak anlamlı biçimde lümen çapı geniş bulunmuştur ($P = 0.003$).

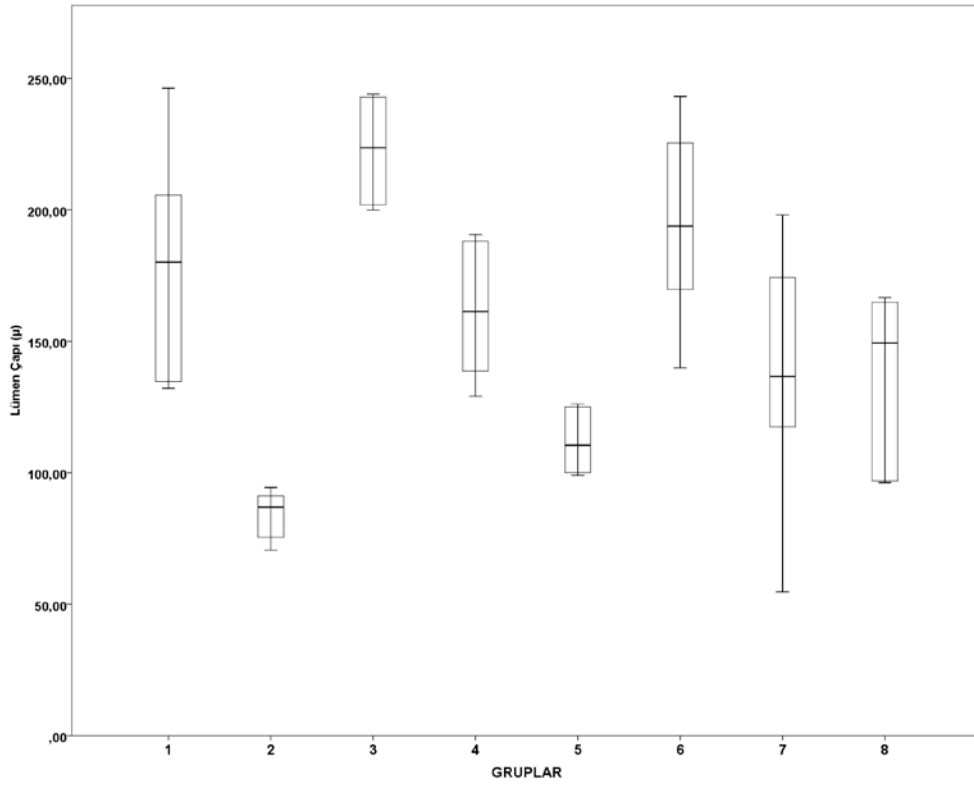
NaHS grubuna (3. Grup) göre, AOAA grubunda (5. Grup) istatistiksel olarak anlamlı biçimde lümen çapı dar bulunmuştur ($P = 0.013$).



Resim 8: SAK grubundaki ratlardan birine ait vazospazmlı baziler arter kesiti



Resim 9: NaHS grubundaki ratlardan birine ait baziller arter kesiti



Grafik 1: Baziller arter lümen çapının gruplar arasındaki dağılımını gösteren grafik

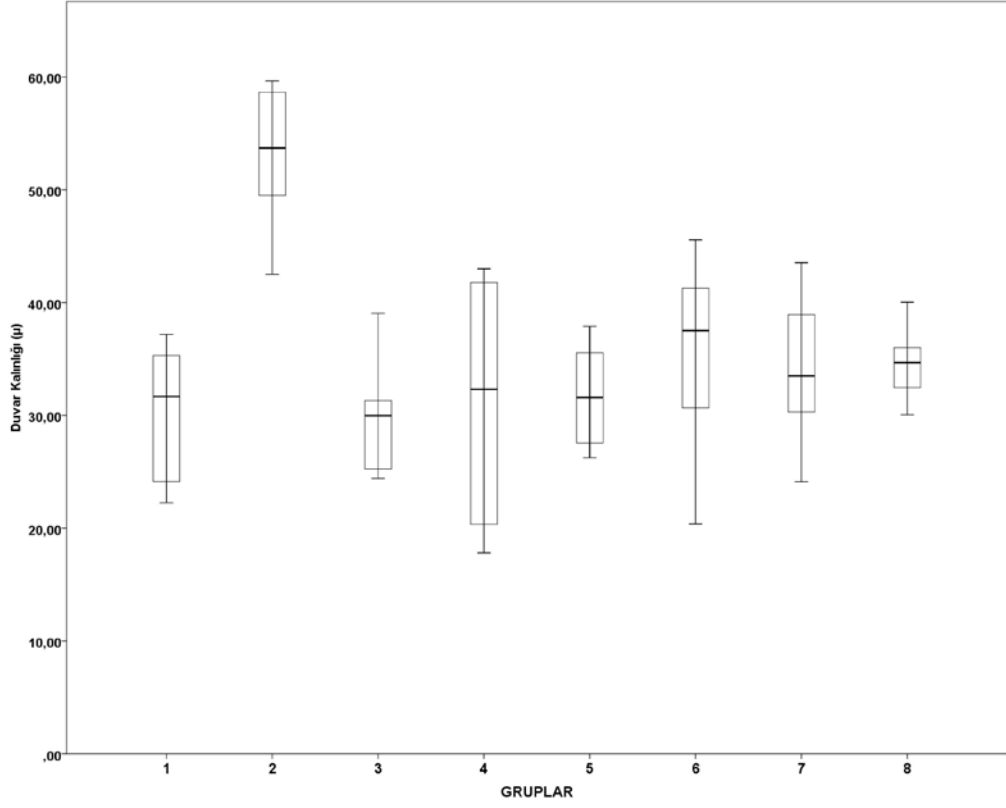
4.2. Baziler Arter Duvar Kalınlıkları

Tüm ratların baziler arter duvar kalınlıkları, damar duvarının en ince ve en kalın değerlerinin ortalaması alınmak suretiyle ölçüm yapılmıştır. Analizler medyan değerler üzerinden yapılmıştır.

Kruskal Wallis analizine göre gruplar arasında duvar kalınlığı ($\chi^2 (7) = 17.582, p=0.014$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır.

Buna göre kontrol grubuna göre (1. Grup), SAK grubunda (2. Grup) istatistiksel olarak anlamlı biçimde duvar kalınlığı fazla bulunmuştur ($p=0.023$).

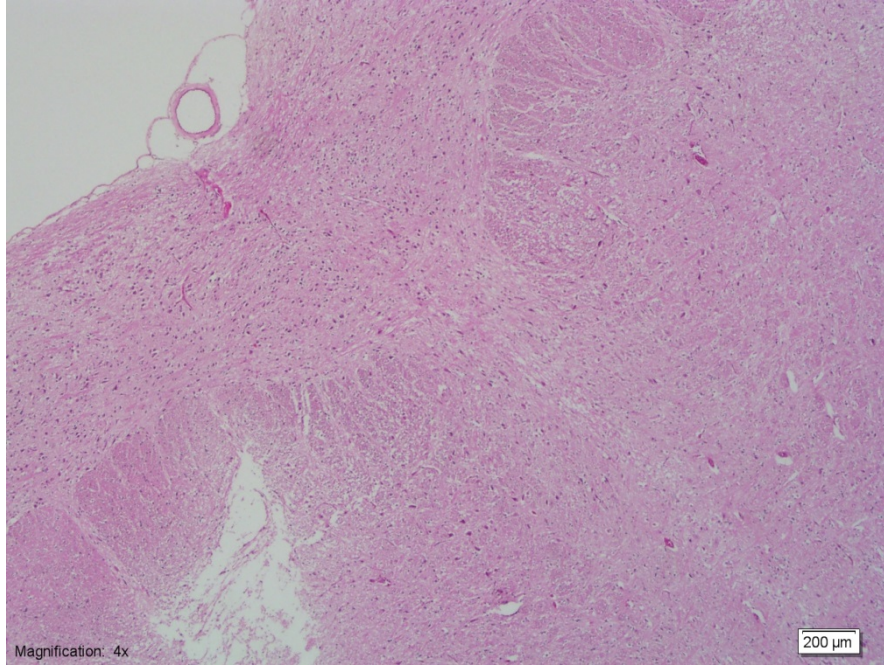
SAK grubu ile (2. Grup) ve NaHS grubu (3. Grup) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktaydı ($p=0.009$).



Grafik 2: Baziller arter duvar kalınlığının gruplar arasında dağılımını gösteren grafik

4.3. Beyin Sapı CBS Ekspresyonu

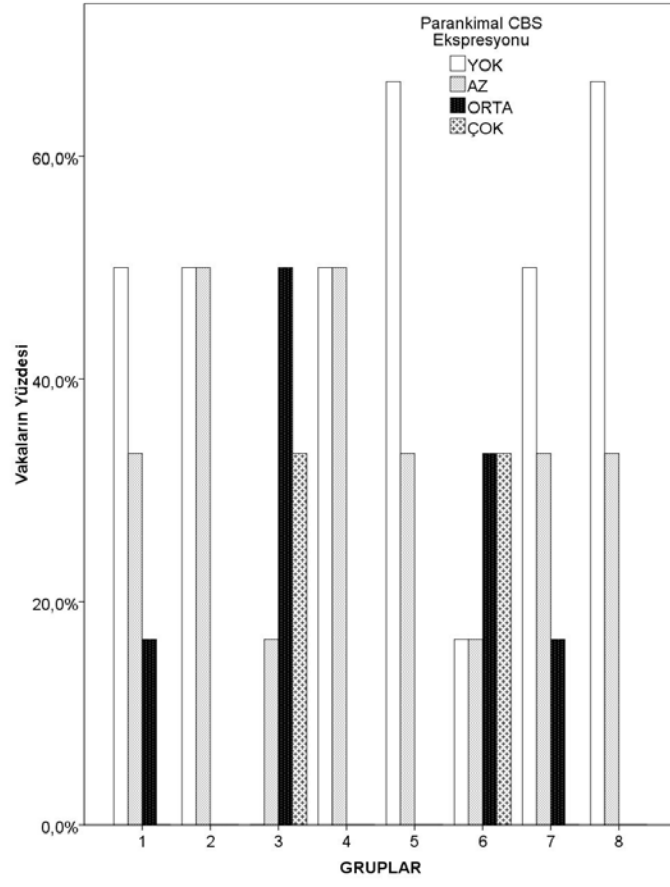
Tüm ratların beyin sapında CBS ekspresyonu incelenip, analiz yapıldığında, tüm gruplara göre NaHS grubunda (3. Grup) CBS ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur. Resim 10' da beyin sapı ve baziller arter kesiti izlenmektedir. Resim 11-14'de beyin sapı CBS ekspresyonunu gösteren kesitler izlenmektedir.



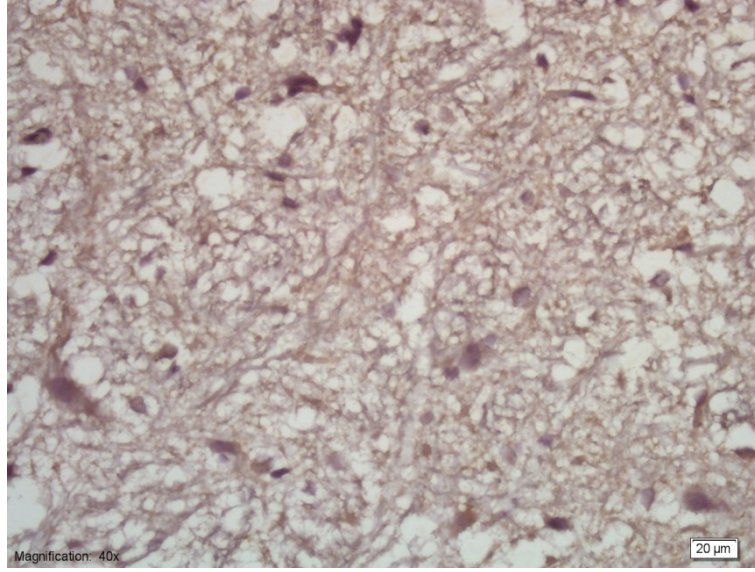
Resim 10: Beyin sapı ve baziller arter kesiti (H&E x 40)

Tablo 4: Tüm gruplarda beyin sapı CBS ekspresyonu şiddetini gösteren tablo

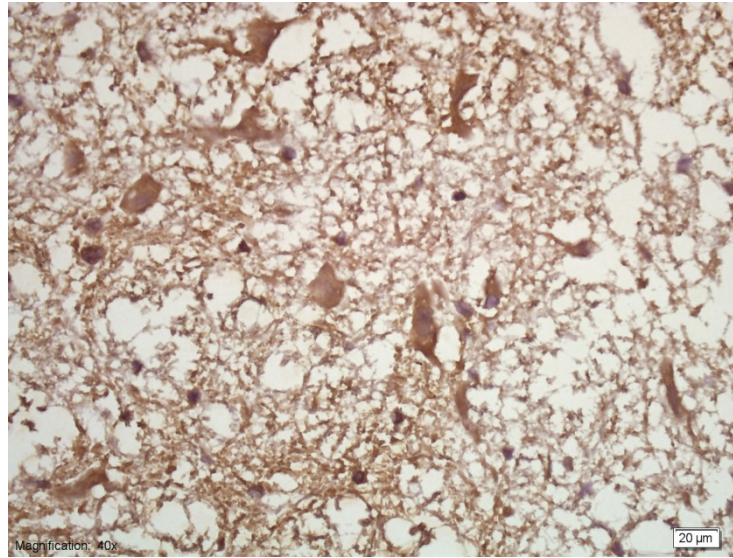
GRUP	BEYİN SAPI CBS EKSPRESYONU							
	YOK		HAFİF		ORTA		YÜKSEK	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
1	3	50	2	33.3	1	16.7	0	0
2	3	50	3	50	0	0	0	0
3	0	0	1	16.7	3	50	2	33.3
4	3	50	3	50	0	0	0	0
5	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0
6	1	16.7	1	16.7	2	33.3	2	33.3
7	3	50	2	33.3	1	16.7	0	0
8	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0



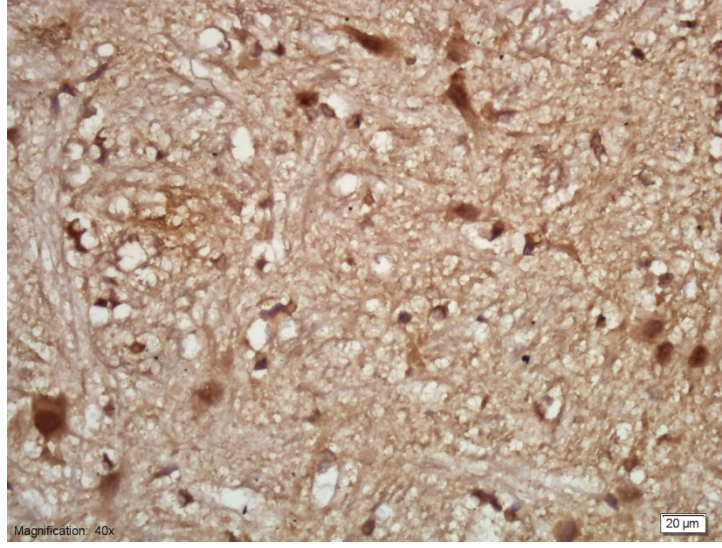
Grafik 3: Tüm gruplarda beyin sapı CBS ekspresyonu şiddetini gösteren grafik



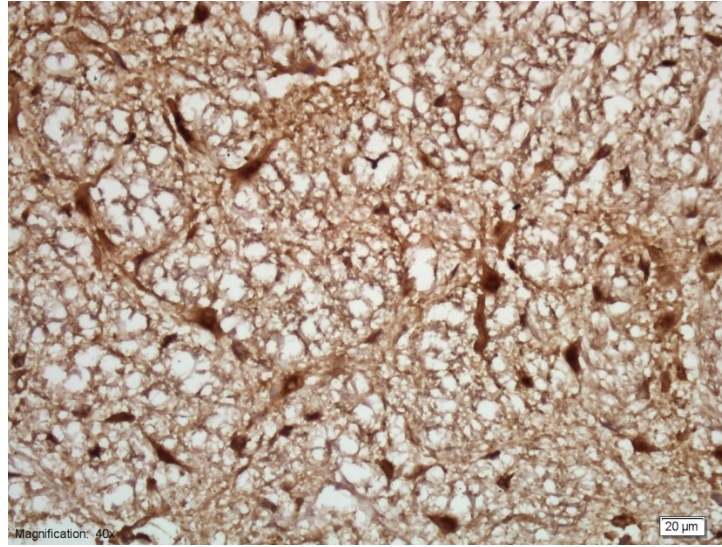
Resim 11: CBS ekspresyonu olmayan beyin sapı preparatı. (CBS antikorü, streptavidin-biotin peroksidaz x 400



Resim 12: Hafif şiddette (+) CBS ekspresyonu olan beyin sapı preparatı. (CBS antikorü, streptavidin-biotin peroksidaz x 400



Resim 13: Orta şiddette (++) CBS ekspresyonu olan beyin sapı preparatı. (CBS antikoru, streptavidin-biotin peroksidaz x 400)



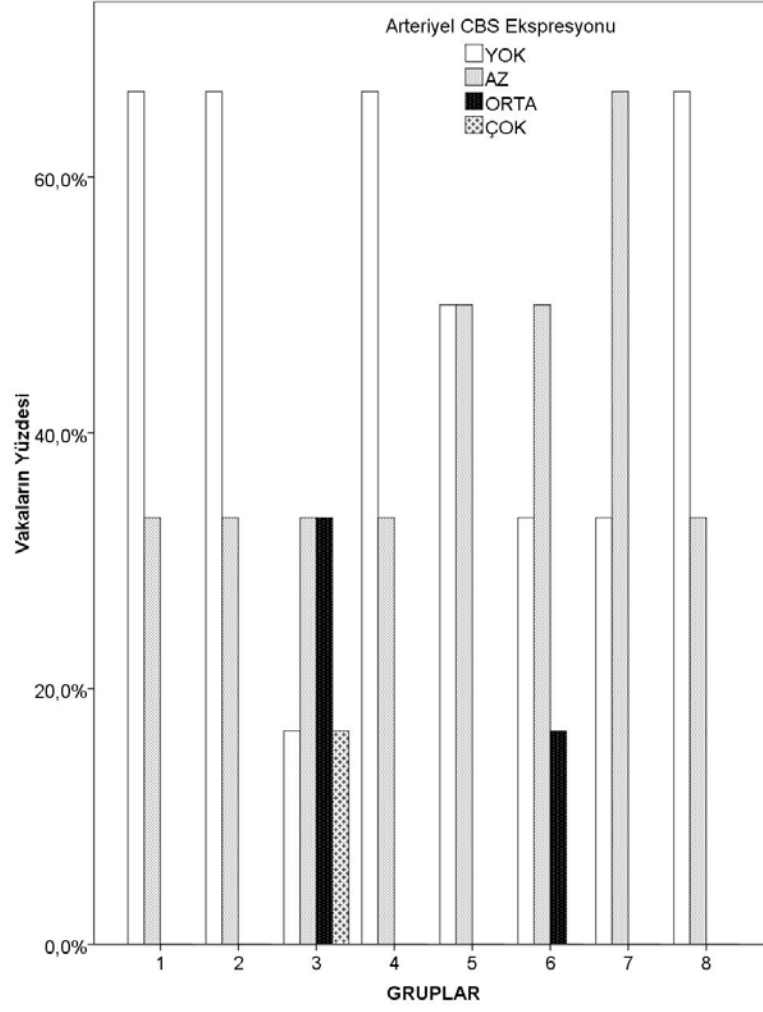
Resim 14: Yüksek şiddette (+++) CBS ekspresyonu olan beyin sapı preparatı. (CBS antikoru, streptavidin-biotin peroksidaz x 400)

4.4. Baziler Arter CBS Ekspresyonu

Tüm ratların baziler arterlerinde CBS ekspresyonu incelenip, analiz yapıldığında tüm gruplara göre NaHS grubunda (3. Grup) CBS ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur.

Tablo 5: Tüm gruplarda baziler arter CBS ekspresyon şiddetini gösteren tablo

GRUP	BAZİLER ARTER CBS EKSPRESYONU							
	YOK		HAFİF		ORTA		YÜKSEK	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
1	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0
2	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0
3	1	16.7	2	33.3	2	33.3	1	16.7
4	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0
5	3	50	3	50	0	0	0	0
6	2	33.3	3	50	1	16.7	0	0
7	2	33.3	4	66.6	0	0	0	0
8	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0



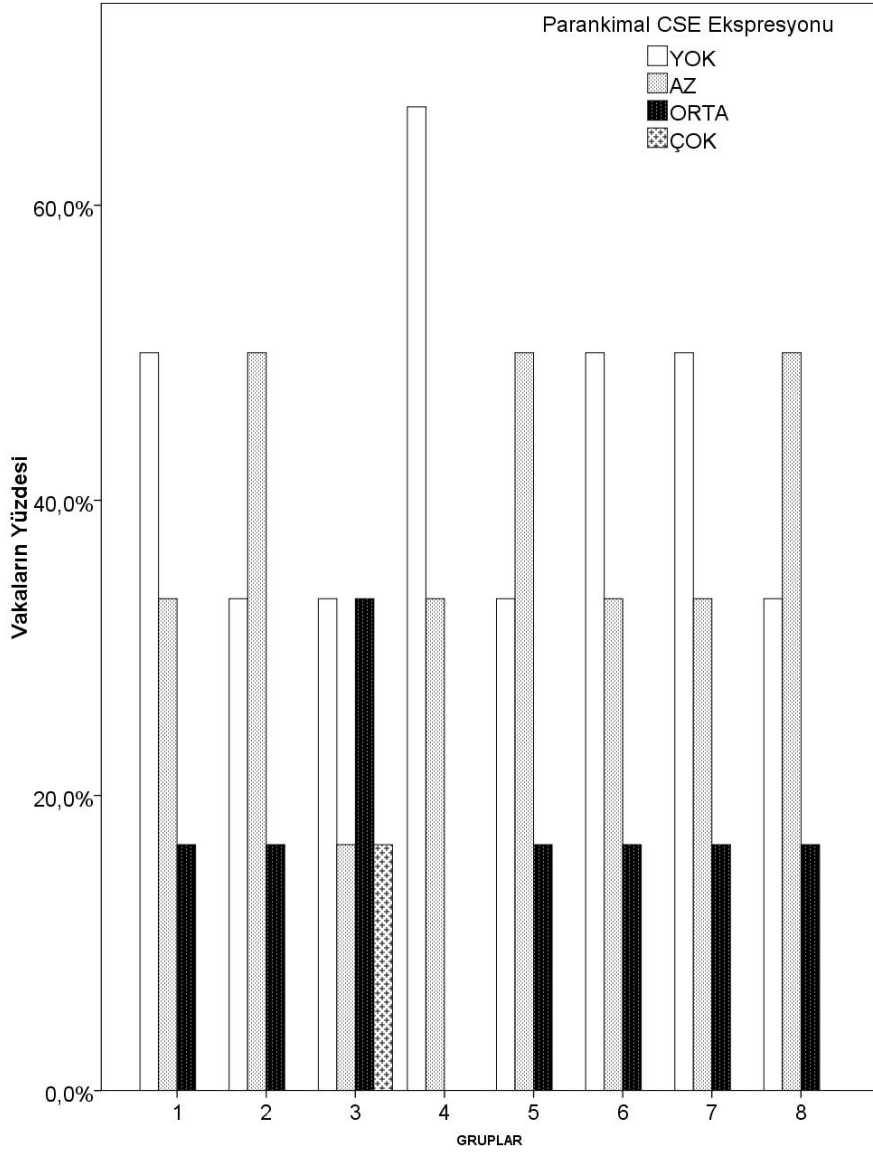
Grafik 4: Tüm gruplarda baziler arter CBS ekspresyonu şiddetini gösteren grafik

4.5. Beyin Sapı CSE Ekspresyonu

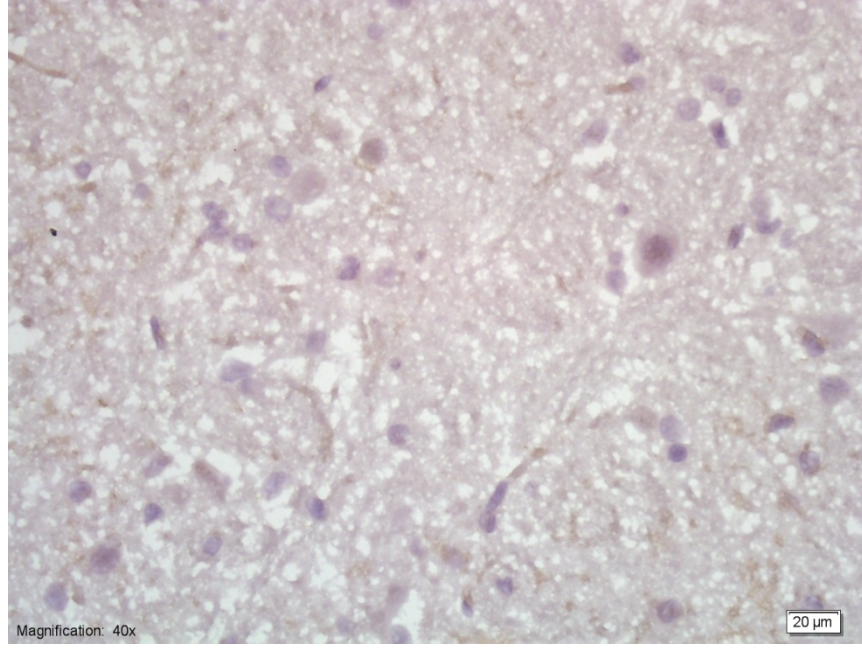
Tüm ratların beyin sapında CSE ekspresyonu incelenip, analiz yapıldığından tüm gruplara göre NaHS grubunda (3. Grup) CSE ekspresyonunun ılımlı biçimde yüksek olduğu bulunmuştur. Resim 15-18' de beyin sapı CSE ekspresyonunu gösteren kesitler izlenmektedir.

Tablo 6: Tüm gruplarda beyin sapı CSE (CTH) ekspresyon şiddetini gösteren tablo

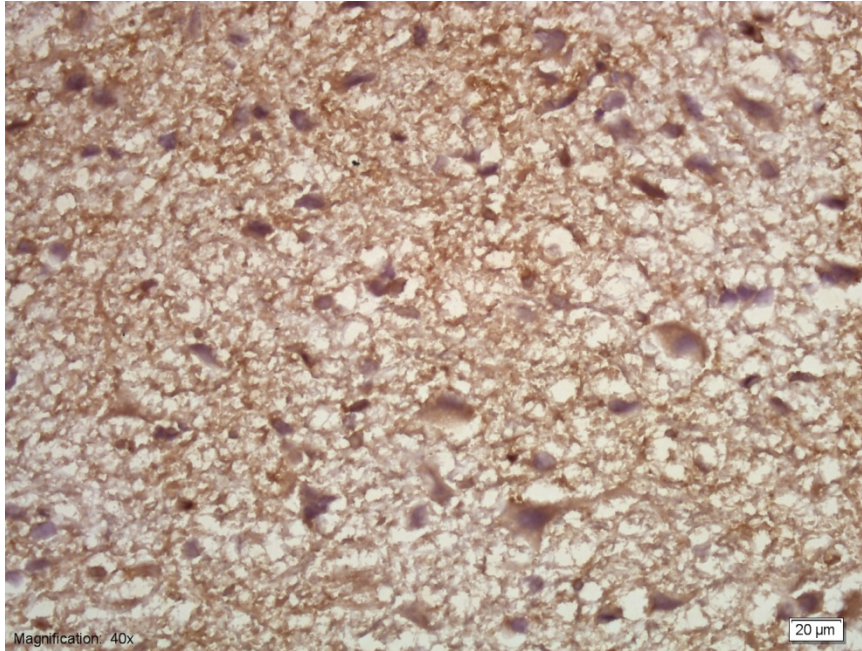
GRUP	BEYİN SAPI CSE EKSPRESYONU							
	YOK		HAFİF		ORTA		YÜKSEK	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
1	3	50	2	33.3	1	16.7	0	0,0
2	2	33.3	3	50	1	16.7	0	0,0
3	2	33.3	1	16.7	2	33.3	1	16,7
4	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0,0
5	2	33.3	3	50	1	16.7	0	0,0
6	3	50	2	33.3	1	16.7	0	0,0
7	4	50	2	33.3	1	16.7	0	0,0
8	2	33.3	3	50	1	16.7	0	0,0



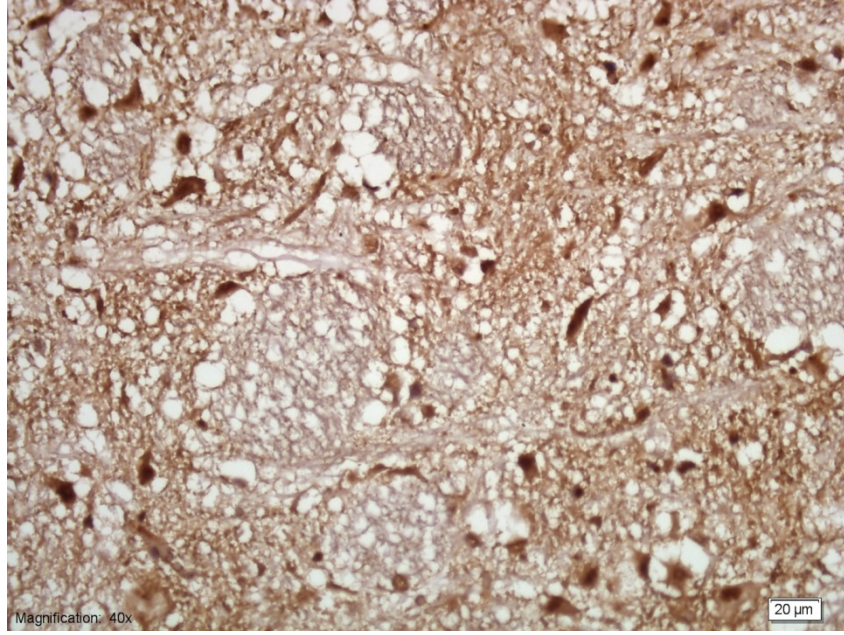
Grafik 5: Tüm gruplarda beyin sapı CSE ekspresyonu şiddetini gösteren grafik



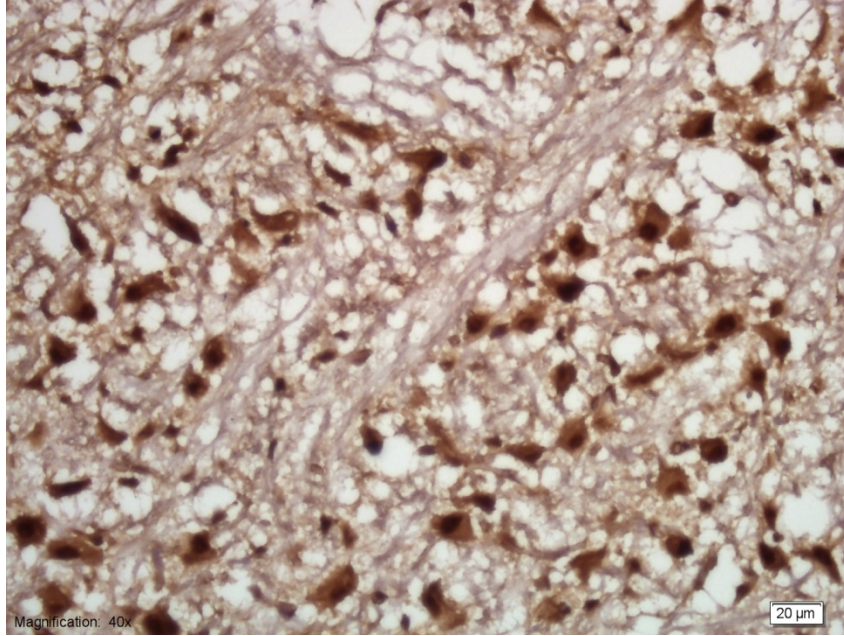
Resim 15: CSE ekspresyonu olmayan beyin sapı preparatı. (CSE antikorü, streptavidin-biotin peroksidaz x 400)



Resim 16: Hafif şiddette (+) CSE ekspresyonu olan beyin sapı preparatı. (CSE antikorü, streptavidin-biotin peroksidaz x 400)



Resim 17: Orta şiddette (++) CSE ekspresyonu olan beyin sapı preparatı. (CSE antikoru, streptavidin-biotin peroksidaz x 400)



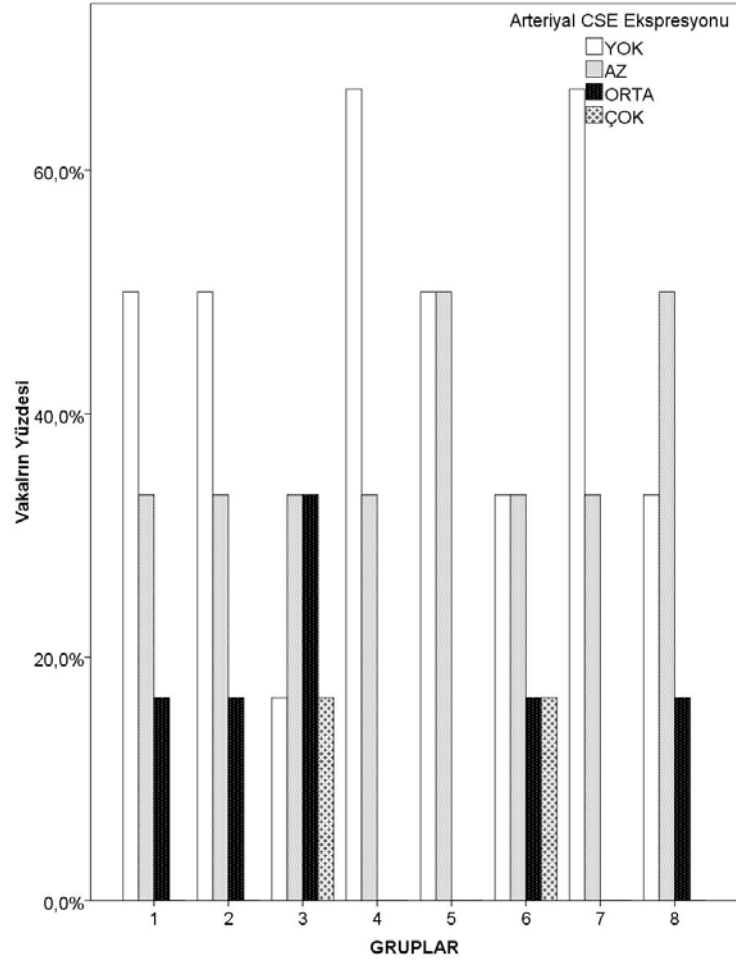
Resim 18: Yüksek şiddette (+++) CSE ekspresyonu olan beyin sapı preparatı. (CSE antikoru, streptavidin-biotin peroksidaz x 400)

4.6. Baziler Arter CSE Ekspresyonu

Tüm ratların baziler arterlerinde CSE ekspresyonu incelenip, analiz yapıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur.

Tablo 7: Tüm gruplarda baziler arter CSE ekspresyon şiddetini gösteren tablo

GRUP	BAZILER ARTER CSE EKSPRESYONU							
	YOK		HAFİF		ORTA		YÜKSEK	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
1	3	50	2	33.3	1	16.7	0	0
2	3	50	2	33.3	1	16.7	0	0
3	1	16.7	2	33.3	2	33.3	1	16.7
4	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0
5	3	50	3	50	0	0	0	0
6	2	33.3	2	33.3	1	16.7	1	16.7
7	4	66.7	2	33.3	0	0	0	0
8	2	33.3	3	50	1	16.7	0	0



Grafik 6: Tüm gruplarda baziler arter CSE ekspresyonu şiddetini gösteren grafik

5. TARTIŞMA

Son yıllarda giderek artan biçimde yapılan çalışmalar, H₂S'in endojen bir gaz nörotransmitter olduğunu, sürekli üretildiğini, hızlı iletilendiğini, yaygın etkide bulunduğunu ve hızla inaktive edildiğini göstermektedir ⁷⁶.

Özellikle kardiyovasküler sistemde kanıtlanmış vazodilatatör etkinliği ve vazodilatasyon oluşturma mekanizmaları serebral arterlerde de etkisinin olup olmadığı sorusunu akla getirmiştir ^{58, 59, 62, 63, 65, 67, 68, 95}. Özellikle serebral iskemide vazodilatasyon oluşturma ve nöral koruma potansiyeli üzerinde durulmuştur.

Rat orta serebral arterinde H₂S'in etkinliğini araştıran çalışmada, H₂S'in serebral vasküler fonksiyonda rol oynadığı (vazodilatasyon), bu etkinin oluşmasında L Tipi kalsiyum kanalları, K_{ATP}, K_v, K(Ca) ve K_{ir} kanallarının rolü olduğu gösterilmiştir ⁹⁵.

Liu ve ark.'nın 2012 yılında yayınladığı çalışmada H₂S'in ratların serebral arterlerindeki myojenik yanıtta etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada bir grup rata 3 hafta boyunca NaHS uygulanmış ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Doz bağımlı olarak NaHS'in arterial basınç yüksekliğine bağlı miyojenik yanıtı (vazokonstriksiyon) baskıladığı, bu etkinin K⁺ kanal blokörü glibenklamidle zayıfladığı, endoteli çıkarılan arterlerde kaybolduğu gösterilmiştir ⁹⁶.

Han ve ark.'nın 2013 yılında yayınlanan makalesinde serebral iskemi-reperfüzyon uygulanmış ratların serebral arterlerinde H₂S'in vazodilatasyon ve hiperpolarizasyon yaptığı gösterilmiş ve H₂S'in rat serebral arterlerinde EDHF'nin (Endotel Derived Hyperpolarisation Factor) eşi olduğu iddia edilmiştir ⁹⁷.

H₂S'in beyindeki etkileri çalışmalara göre değişkenlik göstermektedir. Tay ve ark.' ın yaptığı vitro çalışmada fizyolojik konsantrasyonda H₂S'in nöronları hipoksik hasardan koruduğunu göstermişlerdir ⁹⁸. Düşük dozlarda nöroprotektif olduğunu gösteren başka çalışmalar ^{88, 99, 100, 101,} olduğu gibi yüksek dozda sitotoksik olduğunu kanıtlayan araştırmalar ^{57, 102} da bulunmaktadır.

Li ve ark.'nın çalışmasında fokal serebral iskemi modelinde NaHS yüksek (11.2mg/kg) ve düşük (2.8mg/kg) dozda uygulandığında ortaya çıkan etkiler incelenmiştir. Düşük doz grubunda infarkt hacminin ve yapısal hasarın daha az olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu grupta kaspaz-3 gibi apoptoz markerları ve zararlı radikal düzeyleri de daha düşük bulunurken, anti-apoptotik bcl-2 proteinleri ve anti-oksidan düzeyleri daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu alışma, H₂S'in doz bağımlı olarak farklı etkinliklerde bulunabileceğini göstermekte ve çalışmalar arasındaki çelişkili sonuçlara bir açıklama getirmektedir ¹⁰³.

Minamishima ve ark, yakın tarihli bir çalışmada H₂S donörü NaHS'in kardiyak arrest/ressıtasyonla oluşturulan global iskemi modelinde, e-NOS aracılığıyla nörolojik fonksiyonları iyileştirdiği, nöronal ölüm ve apoptozu azalttığını göstermişlerdir ¹⁰⁴.

Başka bir çalışmada ise kalıcı OSA tıkanıklığı sonrası NaHS'in infarkt hacmini 24 saat içinde arttırdığı saptanmıştır. Ancak bu çalışmada kullanılan NaHS dozu nöral korunmayı destekleyen çalışmalardaki dozun 10 katıdır ¹⁰⁵.

NMDA reseptörlerinde ve voltaj bağımlı Ca⁺⁺ kanallarında, e-NOS üzerinde modulatör etkinliği olması nedeniyle CSD'e (kortikal yayılan depresyon) de etkisi olabileceği ve bu sayede nöral korunmada etkili olabileceği de düşünülmektedir ^{31, 34, 35}. Hidrojen sülfürün, potasyum kanallarında akımı arttırarak, hücrelerde hiperpolarizasyona yol açması ⁴⁹,

⁵² ve hemoglobine bağlanarak NO hasarını azaltmasıyla da SAK'da nöral korumanın olası mekanizmaları olabilir ¹⁰⁶.

Yukarıda özetlemeye çalıştığımız, iskemik hasarda H₂S'in rolünü inceleyen çalışmalarda birbirine zıt sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bu değişkenliklerde doz, model, metod farklılıkları göze çarpmaktadır. H₂S'in çok kısa yarı ömre sahip olması da bu tip çalışmalar için bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Anevrizmal SAK sonrası gelişen serebral vazospazm (gecikmiş iskemik nörolojik defisit), günümüzde halen patofizyolojisi net olarak aydınlatılmamış ve etkin tedavisi olmayan, önemli morbidite ve mortalite oranlarına sahip bir patolojidir. Anevrizmal SAK sonrası vazospazmı önlemeye yönelik olarak başlangıçta çok umut veren ama daha sonra anlamlı klinik sonuçlara ulaşılamayan kalsiyum kanal blokörlerinden sonra endotelin reseptör antagonisti olan clazosentanın da beklenen klinik iyileşmeyi sağlayamaması nedeniyle yeni ajanlar ve mekanizmaların arayışı sürmektedir ^{2, 8, 107}.

Hidrojen sülfürün anevrizmal subaraknoid kanama sonrası gelişen gecikmiş iskemik nörolojik defisitle ilişkisini araştıran ilk çalışmada Grobelny ve ark.'nın anevrizmal subaraknoid kanama sonrası CBS'nin fonksiyon kazandırma polimorfizmleri ve gecikmiş serebral iskemi araştırılmıştır. Araştırmacılar CBS geninde fonksiyon kazandırma polimorfizmi olan hastalarda, SAK sonrası gecikmiş iskemik nörolojik defisit gelişme olasılığının daha düşük olacağı hipotezi ile 87 SAK'lı hastada yanak mukozasındaki örneklerde PCR ile CBS genine ait 3 fonksiyonel polimorfizmi ve serum homosistein seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçların klinik olarak gecikmiş serebral iskemi saptanan hastalarla ilişkisi ortaya konulmuştur. Buna göre saptanan polimorfizmlerin hiçbirisinin anjiyografik vazospazmla anlamlı ilişkisi bulunamamıştır. Serum homosistein düzeyleriyle de klinik ve radyolojik vazospazm arası anlamlı

ilişki saptanamamıştır. Başvuru sırasında hipertansiyonu kontrol altına alınan hastalarda 844WT/ins genotipinde fonksiyon kazandıran polimorfizimli hastalarda gecikmiş serebral iskemi daha az bulunmuştur. Bu çalışma, anevrizmal SAK sonrası gelişen vazospazmda hidrojen sülfürün rolü olabileceği görüşünü desteklemektedir ¹⁰⁵. Bu klinik çalışma, genetik zeminde H₂S'in serebral vazospazmdaki rolünü incelemiştir. Bizim çalışmamız deneysel olmakla beraber, SAK'ta H₂S sentezleyen enzimlerin ekspresyonunu ve damardaki değişiklikleri, H₂S inhibitör ve aktivatörleri kullanarak doğrudan ve geniş çaplı incelemeye yönelik olarak planlanmıştır.

Gruplar arasında baziler arter lümen çapı değişiklikleri bakımından değişiklik olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için en geniş ve en dar lümen çapı değerlerinin medyanı alınarak istatistiksel analiz yapıldığında kontrol grubuna (1. Grup) oranla SAK grubunda (2. Grup) istatistiksel anlamlı biçimde vazospazm, NaHS grubunda (3. Grup) ise yine istatistiksel olarak anlamlı şekilde vazodilatasyon olduğu saptanmıştır. SAK grubuna göre (2. Grup), NaHS verilip SAK yapılan grupta (6. Grup) anlamlı biçimde damar çapı daha geniş bulunmuştur. CSE enzim inhibitörü AOAA uygulanan grupta (5. Grup) da damar çapı, H₂S donörü olan NaHS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha dar bulunmuştur. Bu sonuçlar bize sisterna mangaya otolog arteriyel kan enjeksiyonunun baziler arterde vazokonstriksiyon oluşturduğunu, intraperitoneal 0.018mmol/kg NaHS uygulamasının normal damarlara göre vazodilatasyon oluşturduğunu göstermektedir. CSE inhibitörü AOAA'nın normal damarlarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, H₂S donörüne göre anlamlı vazokonstriksiyon yaptığı saptanmıştır. NaHS uygulaması sonrası SAK yapıldığında ortaya çıkan vazospazm, sadece SAK yapılan gruplarda ortaya çıkan vazospazma göre daha hafiftir. Bu sonuçlar fizyolojik şartlardaki serebral arterlerde H₂S'in vazokonstriksiyon ve vazospazm gibi olaylarda rol oynadığını

desteklemektedir. Bu çalışmanın temel hedefi olan SAK'a bağlı vazospazmda H₂S'in etkileri bakımından değerlendirildiğinde ise H₂S'in vazospazm şiddetini azalttığı ortaya konmuştur.

Damar duvar kalınlıkları incelendiğinde kontrol grubuna (1. Grup) oranla, SAK grubunda (2. Grup) istatistiksel olarak anlamlı biçimde damar duvarında kalınlaşma, NaHS grubunda (3. Grup) istatistiksel olarak anlamlı biçimde inceltme saptanmıştır. SAK öncesi uygulanan H₂S donör ve inhibitörlerinin damar duvar kalınlığına istatistiksel olarak anlamlı etki yapmadığı görülmüştür. H₂S donörü verilerek SAK oluşturulan grupta duvar kalınlığı diğer gruplara oranla daha az olsa da anlamlı değerlere ulaşmamaktadır. Damar duvarında kalınlaşma genellikle vazospazma eşlik eden bir bulgudur ancak mutlaka ortaya çıkması gerekmez. Damar duvar kalınlığı, serebral kan akımı yönünden de lümen çapı kadar etkili olmasa da patofizyolojik mekanizmalar yönünden önem taşımaktadır. Çalışmamızda SAK gruplarındaki ajanların damar duvar kalınlıklarına etki etmemesi, denek sayısının istatistiksel olarak anlam ifade edebilecek minimum sayıda tutulmasına bağlı olabilir. Daha fazla sayıda hayvanla yapılacak bir çalışmada farklı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca çalışmamızın diğer deneysel SAK çalışmalarında olduğu gibi, klinikteki seyirden en önemli farkı, hayvanların SAK sonrası 24. saatte feda edilerek doku örneklerinin alınmasıdır. Klinikte ise SAK sonrası vazospazm 3 ve 7. günler arasında ortaya çıkmakta veya şiddetlenmektedir. Bu zaman uyumsuzluğu bu tip çalışmalarda farklı sonuçlar ve klinikle uyumsuz bulgular elde edilmesindeki en önemli nedenlerdendir. Deney modellerinde, hayvanların 3. günden sonra feda edilmesi durumunda ise mortalite çok yükselmektedir. Çalışmaların çoğunda SAK sonrası 24. saatte vazospazm oluşuyor olması da çalışmacıları erken dönemde incelemeye yöneltmektedir⁹⁴.

H₂S sentezleyen enzimlerin (CBS ve CSE) immunhistokimyasal yöntemlerle ekspresyonuna bakılarak, hem

damardaki lümen ve duvar kalınlığındaki değişikliklerle paralellik gösterip, göstermediğini kontrol etmek hem de beyin sapında ve baziler arterde hangi enzimin daha etkili olduğu saptamak istenmiştir.

Bilindiği üzere CBS, astrositlerde ve mikroglia hücrelerinde bulunur. CSE ise asıl olarak kardiyovasküler sistemde bulunmakla beraber mikroglia da eksprese olur²⁰. Dolayısıyla beklentimiz beyin sapı kesitlerinde CBS hakimiyeti, baziler arterde ise CSE enzim ekspresyonunun fazlalığıydı ve beyin sapı kesitlerinde CBS ekspresyonu biraz daha yüksek bulundu (tüm gruplar incelendiğinde CBS ekspresyonu: 4 yüksek, 7 orta şiddette, CSE ekspresyonu: 1 yüksek, 8 orta). Ekspresyon şiddeti NaHS gruplarında fazla, PPG ve AOAA gruplarında daha düşüktü.

Baziler arterde enzim ekspresyonları incelendiğinde ise CSE ve CBS arasında önemli farklılık saptandı. Tüm gruplarda baziler arterde CSE ekspresyonu (6 orta 2 yüksek şiddette), CBS ekspresyonuna (3 orta, 1 yüksek şiddette) göre yüksek bulundu. Ayrıca NaHS uygulanan gruplarda (3 ve 6. Gruplar) ekspresyon oranı daha fazlaydı.

Damar lümen çapı değişiklikleri ile CSE ekspresyonu arasındaki ilişki incelendiğinde NaHS grubunda ortaya çıkan belirgin vazodilatasyonu açıklar biçimde baziler arterde NaHS'in anlamlı biçimde CSE ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. CSE inhibitörü AOAA verilen grupta (5. Grup) CSE ekspresyonu düşük (orta ve yüksek şiddette boyanma yok) bulunmakla beraber, SAK yapılan gruplarda sadece H₂S donörü NaHS'in biraz daha fazla CSE ekspresyonuna yol açtığı, H₂S sentezleyen enzim inhibitörlerinin belirgin etki yaratmadığı tespit edilmiştir.

İmmünohistokimyasal bulgular için denek sayısı-grup sayısı-ekspresyon şiddetinin derecelendirilmesi parametrelerinin istatistiksel analizi yapıldığında, analizi mümkün ve değerli kılacak derecede sayısal güçte olmadığı görülmüştür. Bu nedenle immünohistokimyasal sonuçlar

sadece sayısal ve yüzdesel olarak belirtilmiştir. Sonuçta gruplardaki damar lümen çapındaki değişikliklere paralel biçimde CSE enzim ekspresyonu şiddet farklılıkları gözlemlenmiştir. Buna göre H₂S donörü NaHS'in normal baziler arterde ve SAK sonrası vazospazm gelişmiş baziler arterde vazodilatasyona yol açtığı ve vazospazmı hafiflettiği söylenebilir. Bunu da, CSE enzim ekspresyonunu arttırmak suretiyle gerçekleştirdiği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamız serebral arterlerde beyin sapında, fizyolojik şartlarda önemli rol oynadığını desteklemekle beraber, özellikle SAK sonrası gelişen vazospazmda H₂S'in terapötik etki potansiyeli olabileceğini gösteren öncü çalışma niteliği taşımaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bulguların daha geniş çalışmalarla, farklı zaman aralıkları kullanarak farklı dozda uygulamalarla, H₂S'in diğer yöntemlerle tespit edildiği deneylerle desteklenmesi kanaatindeyiz.

Anevrizmal SAK sonrası vazospazm, kabaca makrovasküler yapıların konstriksiyonundan ziyade mikrovasküler yapıların da dahil olduğu karmaşık patofizyolojiye sahip bir olaydır. H₂S'in kanıtlanmış etki mekanizmalarından yola çıkarak vazospazmı azaltabileceği veya yok edebileceği hipotezi, şu an için mevcut çalışmalarla kısmen desteklene bile anevrizmal SAK sonrası nöral hasarı azaltıcı etkisinin varlığı için çok daha geniş kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Hidrojen sülfürün rat baziler arter ve beyin sapında, fizyolojik şartlarda ve subaraknoid kanama sonrası gelişen vazospazmda etkilerini ortaya koymaya yönelik olarak yaptığımız bu çalışmada aşağıda maddeler halinde sıralanan sonuçlar elde edilmiştir.

1. Ratlarda sisterna magnaya otolog arteriyel kan enjeksiyonu baziler arterde vazospazm geliştirmektedir.
2. H₂S donörü NaHS'in intraperitoneal uygulanması normal ratlarda baziler arterde dilatasyona yol açmaktadır.
3. H₂S donörü NaHS'in SAK öncesi intraperitoneal uygulanması, SAK sonrası gelişen vazospazm şiddetini azaltmaktadır.
4. H₂S enzim inhibitörleri AOAA ve PPG'nin intraperitoneal uygulamaları lümen çapında azalmaya neden olmaktadır.
5. Beyin sapında CBS ekspresyonu CSE ekspresyonuna göre daha fazla bulunmuştur.
6. CBS ekspresyonu PPG enjeksiyonu ile azalmakta, NaHS enjeksiyonu ile artmaktadır.
7. Baziler arterde CSE ekspresyonu CBS ekspresyonuna göre daha fazla bulunmuştur.
8. CSE ekspresyonu AOAA enjeksiyonu ile azalmakta, NaHS enjeksiyonu ile artmaktadır.
9. Rat baziler arterinde, fizyolojik şartlarda ve SAK'ta, vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon oluşumunda hidrojen sülfür de rol oynamaktadır.
10. Subaraknoid kanamada beyin sapı ve baziler arterde CSE ve CBS enzim aktiviteleri değişiklik göstermemektedir.

7. ÖZET

Anevrizmal subaraknoid kanama 6-11/100000 insidansa sahiptir. Serebral vazospazm serebral arterlerin daralmasıdır. Semptomatik serebral vazospazm, intrakraniyal arteriyel anevrizma rüptürü sonrası hastaların %30'da ortaya çıkan, subaraknoid kanamaya (SAK) bağlı morbidite ve mortalitenin birinci nedenidir. Neredeyse yarım yüzyıldır, serebral vazospazm konusunda geniş çapta araştırmalar yapılmakla beraber, halen nedenleri ve tedavisi hakkında istenen noktaya gelinememiştir. Etiyolojisinde en çok suçlanan ajanlar kan yıkım ürünleri olmuştur. Tedavide birçok vazodilatatör ajan denenmiş ancak klinikte istenen başarıya ulaşılamamıştır. Günümüzde semptomatik tedavi en geçerli yöntem olup hemodilüzyon, hipertansiyon, hipervolemi uygulanmakta, etkin ajan bulunmamaktadır.

Hidrojen Sülfür (H_2S), nitrik oksit ve karbon monoksitten sonra vücutta bulunan üçüncü gaz yapıdaki nörotransmitterdir. SSS dahil birçok dokuda üretilir. Sistein ve metioninden üretilen H_2S 'in sentezinde sistasyonin β sentaz (CBS) ve sistasyonin γ liyaz (CSE) görev alır. CBS, santral sinir sisteminde H_2S sentezinden sorumlu ana enzimken, CSE daha çok kardiyovasküler sistemde H_2S sentezinde rol oynar. Nöromodülatör ve hücre içi mesajcı görevleri bulunmaktadır. Nörolojik, kardiyovasküler, gastrointestinal, genitoüriner ve endokrin sistemlerde birçok etkisi saptanan, birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynadığı giderek artan biçimde anlaşılan H_2S 'in serebrovasküler sistemdeki rolü tartışmalıdır. İskemik inmede infarkt alanını daralttığı, vasodilatasyon yaptığını gösteren çalışmalara karşın, birçok çalışmada da serebral iskemide nöronal hasara yol açtığı iddia edilmektedir. H_2S , K^+ kanallarını açarak düz kas hücrelerini gevşetir. Periferik vazodilatatör etkinliği bilinen H_2S 'in serebral vazospazmdaki rolü bilinmemektedir.

Bu çalışmada deneysel olarak normal ve serebral vazospazm yaratılmış ratlarda baziler arterde H₂S düzeylerinin saptanması, H₂S donör ve inhibitörleri verilen deneklerde serebral vazospazmın nasıl etkilendiğinin belirlenmesi suretiyle H₂S'in deneysel serebral vazospazmdaki rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

Kontrol, SAK, NaHS, AOAA, PPG, SAK+NaHS, SAK+AOAA ve SAK+PPG gruplarında 6'şar ratın baziler arter lümen çapı ve duvar kalınlıkları ile baziler arterde CBS ve CSE enzim aktiviteleri immünhistokimyasal olarak değerlendirildi.

Çalışmada SAK yapılan ve yapılmayan hayvanlarda NaHS'in belirgin vazodilatatör etkinliği saptanmıştır. Bu etkinlik baziler arterde CSE aktivitesi ile paralellik göstermektedir. AOAA ve PPG baziler arter ve beyin sapında CSE ve CBS enzim aktivitesini azaltmaktadır.

Sonuç olarak SAK sonrası gelişen vazospazmda H₂S'in rolünü inceleyen alışmamızda, H₂S'in sahip olduğu vazodilatatör etkinliği ile terapitik potansiyeli olduğu görülmektedir. Bu potansiyelin daha net biçimde ortaya konabilmesi için daha geniş çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler

Serebral vazospazm, hidrojen sülfür, nöroproteksiyon

8. SUMMARY

Aneurysmal subarachnoid hemorrhage has an incidence of 6-11/100.000. Cerebral vasospasm describes narrowing of cerebral arteries. Symptomatic cerebral vasospasm occurs in approximately 30% of patients after subarachnoid hemorrhage (SAH) due to intracranial aneurysm rupture. It is the primary cause of morbidity and mortality. Almost half a century, researches performed a wide range of cerebral vasospasm study but it is still not at the desired point for the causes and treatment. Blood breakdown products, have been mostly accused in the etiology. In the treatment, many vasodilators had been tested, but they did not reached to the desired success. Today the best method for symptomatic treatment is hemodilution, hypertension, hypervolemia. There is no effective agent.

Hydrogen Sulfide (H_2S), the third gaseous neurotransmitter after nitric oxide and carbon monoxide in the body. It is produced in many tissues, including the CNS. H_2S is produced from cysteine and methionine, by cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). CBS is the major enzyme which is responsible for the synthesis of H_2S , in the central nervous system, while CSE is more effective in the cardiovascular system. H_2S serves as neuromodulator and intracellular messenger. In neurological, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinary, and endocrine systems many effects of H_2S have been identified. It plays many roles in many physiological and pathological conditions, but its effects on cerebrovascular system are controversial. Although some studies reported that H_2S decreases the infarct volume and causes vasodilatation, many researches showed that it causes neuronal damage in ischemia. H_2S relaxes smooth muscle cells by opening K^+ channels. H_2S has well-known peripheral vasodilator activity, but the role in cerebral vasospasm is not clear.

In this study, in normal rats and rats with cerebral vasospasm, investigating the role of H₂S, by detecting the H₂S levels in basilar artery and analysing how the H₂S donors and inhibitors effect the cerebral vasospasm were aimed.

In control, SAH, NaHS, AOAA, PPG, SAH+NaHS, SAH+AOAA and SAH+PPG groups, the basilar artery lumen diameter and wall thickness, CBS and CSE enzyme activity in basilar artery and brain stem were assessed by immunohistochemistry. In the study, animals with and without SAH, significant vasodilator activity was determined with NaHS. This activity is in line with the activity of CSE in the basilar artery. CSE and CBS enzyme activity in the brain stem and basilar artery, are decreased by AOAA and PPG.

As a result, the study which examines the role of H₂S in cerebral vasospasm after SAH, the therapeutic potential H₂S with its vasodilator activity is observed. Larger studies are required, in order to clearly expose this potential.

Key Words

Cerebral vasospasm, hydrogen sulfide, neuroprotection

9. KAYNAKLAR

1. Bederson JB, Connolly ES, Batjer HH ve ark: Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A statement for Healthcare Professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. Stroke 2009, 40:994-1025
2. Spears J, Macdonald RL, Weir B: Perioperative management of subarachnoid hemorrhage. Youmans' Neurological Surgery, Winn HR (ed), Elsevier, Philadelphia 2014, sayfa 3772-3790
3. Kocaeli H, Korfalı E: Anevrizmal subaraknoid kanama ve komplikasyonları. Temel Nöroşirürji. Korfalı E, Zileli M (ed). Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları, Ankara, 2010, sayfa 803-814
4. Heros RC, Marcos JJ: Cerebrovascular surgery: past, present and future. Neurosurgery 2000, 47:1007-1033
5. Bederson JB, Awad IA, Wiebers DO ve ark: Recommendations for the management of patients with unruptured intracranial aneurysms: a statement for Healthcare Professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. Stroke 2000, 31:2742-2750
6. Övül İ: Serebral kan akımı ve fizyolojisi. Temel Nöroşirürji. Korfalı E, Zileli M (ed). Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları, Ankara, 2010, sayfa 697-712
7. Faraci M, Heistad DD: Biology of cerebral vascular muscle. Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B (ed). Primer on cerebrovascular diseases. San Diego, London: Academic Press, 1997, 13-16
8. Findlay JM: Cerebral vasospasm in Youmans' Neurological Surgery, Winn HR (ed), Elsevier, Philadelphia 2014, sayfa 3791-3800

9. Qu K, Lee SW, Bian JS, Low CM, Wong PTH: Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochemistry International* 2008, 52:155-165
10. Burnett WW, King EG, Grace M, Hall WF: Hydrogen sulfide poisoning: a review of 5 years' experience. *Can. Med. Assoc. J* 1977, 117:1277-1280
11. Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH: Toxicology of hydrogen sulfide. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992, 32:109-134
12. Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warencya MW, Reiffenstein RJ, Dowling G: Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J. Anal. Toxicol.* 1989, 13:105-109
13. Warencya MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Francom DM, Taylor JD, Dieken FP: Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem. Pharmacol.* 1989, 38:973-981
14. Furne J, Saeed A, Levitt MD: Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, 295: 1479-
15. Whitfield NL, Kreimier EL, Verdial FC, Skovgaard N, Olson KR: Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am J physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, 294: 1930-
16. Baumgart K, Radermacher P, Wagner F. Applying gases for microcirculatory and cellular oxygenation in sepsis: effects of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide. 2009, *Current Opinion in Anesthesiology* 2009, 22:168-176

- 17.** Awata S, Nakayama K, Suzuki I, Sugahara K, Kodama H: Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochem. Mol. Int.* 1995, 35:1331-1338
- 18.** Abe K, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci.* 1996, 1066-1071
- 19.** Qu K, Chen CPLH, Halliwell B, Moore PK, Wong PTH: Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke* 2006. 37:889-893
- 20.** Lee SW, Hu YS, Hu LF, Lu Q, Dawe GS, Moore PK, Wong PTK, Bian JS: Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells. *Glia* 2006, 116-124
- 21.** Gadalla MM, Snyder SH: Hydrogen sulfide as a gasotransmitter *J Neurochemistry* 2010, 113:14-26,
- 22.** Quere I, Paul V, Rouillac C, Janbon C, London J, Demaille J, Kamoun P, Dufier JL, Abitbol M, Chasse JF: Spatial and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 254:127-137
- 23.** Lee M, Schwab C, Yu S, McGeer E, McGeer PL: Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiol. Aging.* 2009, 30(10): 1523-1534
- 24.** Tan BH, Wong PTH, Bian JS: Hydrogen sulfide. A novel signalling molecule in the central nervous system. *Neurochemistry International* 2010, 56:3-10
- 25.** Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H: A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxidants and Redox Signaling* 2009, 11(2):205-214,
- 26.** Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GHJ, Bromberg IL, Cerone R, Fowler B, Gröbe H, Schmidt H, Schweitzer L: The natural history of homocystinuria

due to cystathionine β –synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1985, 37, 1-31

27. Stipanuk MH, Dominy Jr JE, Lee JI, Coloso RM: Mammalian cystine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J. Nutr.* 2006, 136(suppl):1652S-1659

28. Guebel DV, Torres NV: Dynamics of sulfur amino acids in mammalian brain: assessment of the astrocytic-neuronal cysteine interaction by a mathematical hybrid model. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1674:12-28

29. Özkan Y, Özkan E, Şimşek B: Plasma total homocysteine and cysteine levels as cardiovascular risk factors in coronary heart disease. *Int. J. Cardiol.* 2002, 82:269-277

30. Kage S, Kashimura S, Ikeda H, Kudo K, Ikeda N: Fatal and non-fatal poisoning by hydrogen sulphide at an industrial waste site. *J Forensic Sci.* 2002, 47:652-655

31. Kimura H: Hydrogen sulphide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 267:129-133

32. Han Y, Qin J, Chang X, Yang Z, Bu D, Du J: Modulating effect of hydrogen sulphide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats. *Neurosci. Res.* 2005, 53:216-219

33. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C: Endogenous hydrogen sulphide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 318:756-763

34. Kimura Y, Kimura H: Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J*, 2004, 18:1165-1167

35. Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H: Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J* 2004, 18:557-559

36. Wojtera M, Sikorska B, Sobow T, Liberski PP: Microglial cells in neurodegenerative disorders. *Folia Neuropathol.* 2005, 43:311-321
37. Hu LF, Wong PTH, Moore PK, Bian JS: Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 MAPK in microglia. *J Neurochem*, 2007, 100:1121-1128
38. Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000, 103: 211-225
39. Umemura K, Kimura H: Hydrogen sulfide enhances reducing activity in neurons: neurotrophic role of H₂S in the brain? *Antioxid. Redox. Signal* 2007, 9:2035-2041
40. Wong RW, Guillaud L: The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, 15:147-156
41. Hu LF, Wong PT, Moore PK, Bian JS: Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *J Neurochem* 2007b, 100:1121-1128
42. Kyosseva SV: Mitogen-activated protein kinase signalling. *Int Rev Neurobiol* 2004, 59:201-220
43. Monks TJ, Ghersi Egea JF, Philbert M, Cooper AJ, Lock EA: Symposium overview: the role of glutathione in neuroprotection and neurotoxicity. *Toxicol Sci* 1999, 51:161-177
44. Lu M, Hu LF, Hu G, Bian JS: Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Rad Biol Med* 2008, 45:1705-1713
45. Garcia Bereguianin MA, Samhan-Arias AK, Martin-Romero FJ, Gutierrez-Merino C: Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca⁺⁺ channels. *Antioxid Redox Signal* 2008, 10:31-42

- 46.** Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, Sekiguchi F, Wada T, Ichida S, Nishikawa H: Hydrogen sulfide as a novel nociceptive Messenger. *Pain* 2007, 132:74-81
- 47.** Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H, Kawabata A: Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain* 2009, 142:127-132
- 48.** Tian XY, Wong WT, Sayed N, Luo J, Tsang SY, Bian ZX, Lu Y, Cheang WS, Yao X, Chen ZY, Huang Y: NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of L-type voltage sensitive Ca^{2+} channel. *Pharmacol Res* 2012, 65(2):239-46
- 49.** Dawe GS, Han SP, Bian JS, Moore PK: Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K^+ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience* 2008, 152:169-177
- 50.** Kombian SB, Reiffenstein RJ, Colmers WF: The actions of hydrogen sulfide on dorsal raphe serotonergic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 1993, 70-81
- 51.** Yamada K, Inagaki N: Neuroprotection by KATP channels. *J Mol Cell Cardiol.* 2005, 38:945-949
- 52.** Ak M, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R, Amzel LM, Berkowitz DE, Snyder SH: Hydrogen sulphide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res* 2011, 109(11):1259-1268
- 53.** Kimura Y, Dargusch R, Schubert H: Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006, 8:661-670
- 54.** Lee SW, Cheng Y, Moore PK, Bian JS: Hydrogen sulfide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 358:1142-1147

- 55.** Cheung NS, Peng ZF, Chen MJ, Moore PK, Whiteman M: Hydrogen sulfide induced neuronal cell death occurs via glutamate receptor and is associated with calpain activation and lysosomal rupture in mouse primary cortical neurons. *Neuropharmacol* 2007, 53:505-514
- 56.** Dominy JE, Stipanuk MH: New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H₂S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant. *Nutrition Reviews* 2004, 62(9):348-353
- 57.** Bhatia M: Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life* 2005, 57(9):603-606
- 58.** Hosoki R, Matsuki N, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997, 237:527-531
- 59.** Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R: The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* 2001, 20:6008-6016
- 60.** Zhong G, Chen F, Cheng Y, Tang C, Du J: The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J Hypertens* 2003, 21:1879-1885
- 61.** Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H: Changes in arterial hydrogen sulfide content during septic shock and endotoxin shock in rats. *J Infect* 2003, 47:155-160
- 62.** Yan H, Du J, Tang C: The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 313:22-27
- 63.** Li J, Meng Z: The role of sulphur dioxide as an endogenous gaseous vasoactive factor in synergy with nitric oxide. *Nitric Oxide* 2009, 20: 166-174
- 64.** Ali MY, Ping YY, Mok L, Ling M, Whiteman M, Bhatia M, Moore M: Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new

role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol.* 2006, 149:625-634

65. Dora A, Doyle MP, Duling BR: Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc. Natl. Acad USA* 1997, 94:6529-6534

66. Budel S, Schuster A, Stergiopoulos N, Meister JJ, Beny JL: Role of smooth muscle cells on endothelial cytosolic free calcium in porcine coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 281:1156-1162

67. Kida M, Sugiyama T, Yoshimoto T, Ogawa Y: Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Eur J Pharm Sci* 2013, 23,48 (1-2):211-5

68. Martelli A, Testai L, Breschi MC, Lawson K, McKay NG, Micelli F, Tagliatela M, Calderone V: Vasorelaxation by hydrogen sulphid involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacol Res* 2013, 70(1):27-34

69. Pozsgai G, Hajina Z, Bagoly T, Boros M, Kemeny A, Materazzi S, Nassini R, Helyes Z, Szolcsanyi J, Pinter E: The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *Eur J Pharmacol* 2012, 15,689(1-3).56-64

70. Ma B, Liang G, Zhang F, Chen Y, Zhang Y: Effect of hydrogen sulphide on restenosis of peripheral arteries after angioplasty. *Mol Med Rep* 2012, 5(6):1497-502

71. Qu K, Chen CPLH, Halliwell B, Moore PK, Wong PTH: Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke* 2006, 37:889-893

72. Olney JW, Ho OL, Rhee V: Cytotoxic effects of acidic and sulphur-containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Brain Res* 1971, 14:61-76

- 73.** Schurr A, West CA, Heine MF, Rigor BM: The neurotoxicity of sulphur-containing amino acids in energy-deprived rat hippocampal slices. *Brain Res* 1993, 601:317-320
- 74.** Slivka A, Cohen B: Brain ischemia markedly elevates levels of the neurotoxic amino acid cysteine. *Brain Res* 1993, 608:33-37
- 75.** Wong PTH, Qu K, Chimon GN, Seah ABH, Chang HM, Wong MC, Ng YK, Rumpel H, Halliwell B, Chen CPLH: High plasma cyst(e)ine level may indicate poor clinical outcome in acute stroke patients: possible involvement of hydrogen sulfide. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006, 109:115
- 76.** Ren C, Du A, LiD, SuiJ, Mayhan WG, Zhao H: Dynamic change of hydrogen sulfide during global cerebral ischemiareperfusion and its effect in rats. *Brian Res* 2010, 1345:197-205
- 77.** Shao JL, Zhu JC, Wang JK, Ma H: The role of endogenous csytathione beta synthase/hydrogen sulfide and heme-oxygenase -1 /carbon monoxide in a rat model of global cerebral ischemia-reperfusion. *Chin. J. Anesthesiol* 2006, 26:439-442
- 78.** Kontos HA: Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke* 2001, 32:2712-2716
- 79.** Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA: Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol* 1992, 263:1356-1362
- 80.** Meng W, Colonna DM: Nitric oxide and prostoglandins interact to mediate arteriolar dilatation during cortical spreading depression. *Stroke* 1995, 26:176-181
- 81.** Wang YF, Mainalli P, Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yan H, Liu X, Du JB: Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin. Med. J.* 2008, 121:420-423
- 82.** Tang G, Wu L, Liang W, Wang R: Direct stimulation of K (ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 2005, 68:1757-1764

- 83.** Zhao HG, Li WB, Li QJ, Chen XL, Liu HQ, Feng RF, Ai J: Limb ischemic preconditioning attenuates apoptosis of pyramidal neurons in the CA1 hippocampus induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Sheng Li Xue Bao* 2004, 56:407-412
- 84.** Hu LF, Lu M, Wu ZY, Wong PT, Bian JS. Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function. *Mol. Pharmacol.* 2009, 75:27-34
- 85.** Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M: Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Lab. Invest.* 2006, 86:391-397
- 86.** Elrod JW, Calwert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104:15560-15565
- 87.** Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, Szabo C, Sellke FW: The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in esponde to ichemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac. Surg* 2008, 33:906 913
- 88.** Zhang LM, Jiang CX, Liu DW: Hydrogen sulfide attenuates neuronal injury induced by vascular dementia via inhibiting apoptosis in rats. *Neurochem. Res.* 2009, 34:1984-1992
- 89.** Parnetti L, Caso V, Santucci A, Corea F, Lanari A, Floridi A, Conte C, Bottiglieri T: Mild hyperhomocystinemia is a risk factor in all etiological subtypes of stroke. *Neurol Sci* 2004, 25:13-17
- 90.** Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, Bell R, D'Souza R, Jeffery S, Bamford JM, Markus HS: Homocysteine is a risk factor for cerebral small vessel disease, acting via endothelial dysfunction. *Brain* 2004, 127:212-219
- 91.** Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, Shih VE, Silveria S, Plomaritoglou A, Furie KL: Homocysteine, MTHFR 677c-polymorphism

and risk of ischemic stroke: results of meta-analysis. *Neurology* 2002, 59:529-536

92. Fallon UB, Elwood P, Ben-Shlomo Y, Ubbink JB, Greenwood R, Smith GD: Homocysteine and ischemic stroke in men: the Caerphilly study. *J Epidemiol. Commun. Health* 2001, 55:91-96

93. Morrison LD, Smith DD, Kish SJ: Brain S-adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1996, 67:1328-1331

94. Marbacher S, Fandino J, Kitchen ND: Standard intracranial in vivo animal models of delayed cerebral vasospasm. *British J Neurosurg* 2010, 24(4):415-434

95. Streeter E, Hart J, Badoer E: An investigation mechanism of hydrogen sulphide-induced vasorelaxation in rat middle cerebral arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012, 385(10):991-1002

96. Liu L, Liu H, Sun D, Qiao W, Qi Y, Sun H, Yan C: Effects of H₂S on myogenic response in rat cerebral arterioles. *Circ J* 2012, 76(4):1012-1019

97. Han J, Chen ZW, He GW: Acetylcholine and sodium hydrosulfide induced endothelium dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia reperfusion rat. *J Pharmacol Sci* 2013, 121:318-326

98. Tay AS, Hu LF, Lu M, Wong PT, Bian JS: Hydrogen sulfide protects neurons against hypoxic injury via stimulation of ATP sensitive potassium channel/protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase/heat shock protein 90 pathway. *Neuroscience* 2010, 167(2):277-286

99. Kang K, Zhao M, Jiang H, Tan G, Pan S, Sun X: Role of hydrogen sulfide in hepatic ischemia-reperfusion induced injury in rats. *Liver Transpl* 2009, 15:1306-1314

100. Kimura Y, Goto Y, Kimura H: Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid. Redox. Signal* 2010, 12:1-13

101. Pan TT, Chen YQ, Bian JS: All in the timing a comparison between the cardioprotection induced by H₂S preconditioning and post-infarction treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 2009, 616:160-165

102. Yang G, Wu L, Wang R: Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells. *FASEB* 2006, 20:553-555

103. Li GF, Luo HK, Li LF, Zhang QZ, Xie LJ, Jiang H, Li LP, Hao N, Wang WW, Zhang JX: Dual effects of hydrogen sulphide on focal cerebral ischaemic injury via modulation of oxidative stress-induced apoptosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012, 39 (9): 765-771

104. Minamishima S, Bougaki M, Sips PY ve ark.: Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation* 2009, 120:888-896

105. Grobelny TB, Ducruet AF, DeRosa PA ve ark: Gain-of-function polymorphisms of cystathionine β -synthase and delayed cerebral ischemia following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 2011, 115:101-107

106. Silfa E, Almeida M, Cerda J, Wu S, Lopez-Garriga J: Orientation of the heme vinyl groups in the hydrogen sulfide-binding hemoglobin I from *Lucina pectinata*. *Biospectroscopy* 1998, 4:311-326

107. Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, ve ark.: Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS 1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke* 2008, 39:3015-3021

10. EKLER ETİK KURUL ONAY



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 59-3894
KONU :

01.03/2011

Sayın

Prof.Dr.M.Kemali BAYKANER
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu M.Kemali BAYKANER, Hakan EMMERZ, Hayrunnisa BOLAY BELEN, Alp Özgün BÖRCEK, Sevim ERCAN ve Ümit BAĞRIACIK'tan oluşan, G.Ü.ET-11.020 kod numaralı ve "*Deneysel Serebral Vazospazmda Hidrojen Sülfürün Rolü*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.020 and entitled "*The role of hydrogen sulphide in experimental cerebral vasospasm*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI
KARARLARI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 23.02.2011		TOPLANTI SAYISI : 02
ADI-SOYADI		
Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN	KATILDI	
Prof.Dr.Aydan BABÜL	KATILDI	
Prof.Dr.Nurten TÜRKÖZKAN	KATILDI	
Prof.Dr.M.Tahir HATİPOĞLU	KATILDI	
Prof.Dr.Mustafa ARK	KATILDI	
Doç.Dr.Şule COŞKUN CEVHER	KATILDI	
Uzman Dr.Şeyda DİKER	KATILDI	
Arş.Gör. Esra PER	KATILAMADI	
Dr.Kadir BAŞAR	KATILDI	
İlknur ALKAN	KATILAMADI	

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

11. TEŞEKKÜR

Bu çok zor ve değerli doktora programına başlamam ve bitirebilmem için sürekli destek veren başta program yöneticisi Prof. Dr. Hayrunnisa Bolay Belen'e, Prof. Dr. M. Kemali Baykaner'e, Prof. Dr. Selçuk Candansayar'a, Prof. Dr. Mehmet Kitapçı'ya, tez izleme komitesinde bulunan Prof. Dr. Aylar Poyraz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora programına başlamam için katkıda bulunan, eğitim süresince hem destek veren hem de bu eğitim nedeniyle bölümdeki görevlerimde aksama olduğunda beni anlayışla karşılayan Nöroşirürji Anabilim Dalındaki değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü Aykol'a, Prof. Dr. Aydın Paşaoğlu'na, hem hocam hem abim Prof. Dr. Memduh Kaymaz'a, sebep olduğum her boşluğu dolduran sevgili Uz. Dr. Alp Özgün Börcek'e teşekkür ederim.

Doktora programı süresince birbirimizin sürekli yardımına koştuğumuz, sağlam dostluklar kurduğumuz, öğrenci arkadaşlarım Doç.Dr. Aslıhan Sayın'a, Doç.Dr. Didem Akçalı'ya, Dr. Serap Taycan'a ve Dr. Deniz Eylem Yalçınkaya'ya müteşekkirim.

Histopatolojik değerlendirmeleri yapan arkadaşım Doç. Dr. İpek Işık Gönül'e de verdiği emekler için çok teşekkür ederim.

Son olarak Nöroşirürjiyenlik mesleğinin yoğunluğu nedeniyle zaten çok zaman ayıramazken, bir de doktora programıyla ihmal ettiğim eşim Gökçen ve kızım İpek'e tolerans ve destekleri için teşekkürü borç bilirim.

Saygılarımla

Doç. Dr. Hakan Emmez

12. ÖZGEÇMİŞ

Adı : ÖMER HAKAN

Soyadı : EMMEZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 21.01.1974

Eğitimi :

2012- Halen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji
Anabilim Dalı Doçent Doktor

2007- 2012 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji
Anabilim Dalı Yardımcı Doçent Doktor

2008- Halen Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Nörobilim Doktora Programı öğrencisi

2005- 2007 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji
Anabilim Dalı Uzmanı

1999- 2005 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji
Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

1993- 1999 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

1985- 1992 TED Ankara Koleji

1981- 1986 Ahmet Vefik Paşa İlköğretim Okulu

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Nöroşirürji Derneği

Bilimsel Etkinlikler

Gazi Üniversitesi BAP. 'KRANİYAL VE SPİNAL NÖROŞİRÜRJİKAL HASTALIKLARIN CERRAHİ TEDAVİSİNDE İNTRAOPERATİF MANYETİK REZONANS GÖRÜNTÜLEME, NÖRONAVİGASYON VE ÇOK YÖNLÜ GÖRÜNTÜLEME SİSTEMİNİN MORBİDİTE, MORTALİTE VE SONUCA ETKİLERİ' 01/2011-85. YÜRÜTÜCÜ

Gazi Üniversitesi BAP. 'NAVİGASYONLU O-ARM SİSTEMİNİN ARAŞTIRMA GÖREVLİLERİNİN SPİNAL CERRAHİ EĞİTİMİNE KATKISI' 01/2012-01 YÜRÜTÜCÜ