

Adınızı soyadınızı giriniz

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



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



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**HİDROJEN SÜLFÜRÜN SIĞIR RETİNAL ARTERİNİ
GEVŞETİCİ ETKİSİNDE KALSİYUM DUYARLILAŞTIRICI
MEKANİZMALARIN VE SENTEZİNDEN SORUMLU
ENZİMLERİN İNCELENMESİ**

AYÇA TOPRAK

**DANIŞMAN
PROF. DR. B. SÖNMEZ UYDEŞ DOĞAN**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

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

(DOKTORA TEZİ)

**HİDROJEN SÜLFÜRÜN SIĞIR RETİNAL ARTERİNİ
GEVŞETİCİ ETKİSİNDE KALSİYUM DUYARLILAŞTIRICI
MEKANİZMALARIN VE SENTEZİNDEN SORUMLU
ENZİMLERİN İNCELENMESİ**

AYÇA TOPRAK

**İKİNCİ DANIŞMAN
DOÇ. DR. SELÇUK TAKIR**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Farmakoloji Programında Doktora Öğrencisi Ayça TOPRAK tarafından Prof.Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN'ın danışmanlığında hazırlanan "Hidrojen Sülfürün Sığır Retinal Gevşetici Etkisinde Kalsiyum Duyarlılaştırıcı Mekanizmaların ve Sentezinden Sorumlu Enzimlerin İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 03.07.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



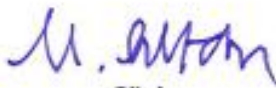
Jüri Başkanı - Danışman
Prof.Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Jüri
Prof.Dr.Gökçe TOPAL TANYILMAZ
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Jüri
Prof.Dr. Zeliha YAZICI
Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı



Jüri
Prof.Dr. V. Melih ALTAN
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Jüri
Doç. Dr. İlkay ALP YILDIRIM
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

BEYAN

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



Ayça TOPRAK

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

“Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: TDK-2018-29789”



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel ve mesleki tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında bana akademik ve manevi destek sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız ve Danışmanım, çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. B. Sönmez UYDEŞ DOĞAN’a,

Bilimsel tecrübeleri ve tavsiyeleri ile Doktora sürecim ve tez çalışmalarım boyunca bana yol gösteren, akademik gelişimimde büyük katkısı olan, bilimsel ve manevi desteğini her zaman hissettiğim ikinci Danışmanım, çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Selçuk TAKIR’a,

Doktora eğitimim boyunca vermiş oldukları akademik ve manevi destek için Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Alper OKYAR, Prof. Dr. Gökçe TOPAL TANYILMAZ, Doç. Dr. İlkay ALP YILDIRIM, Dr. Öğr. Üyesi Deniz KALELİ DURMAN, Dr. Öğr. Üyesi Zeliha PALA KARA ve Dr. Öğr. Üyesi Nihan ÇARÇAK YILMAZ’a,

Her türlü destekleri ile yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Narin ÖZTÜRK, Dr. Öğr. Üyesi Gülsev ÖZEN, Uzm. Ecz. Dilek ÖZTÜRK, Uzm. Ecz. Selin YAMAKOĞLU, Dr. Ecz. Merve KABASAKAL, Dr. Ecz. Armond DACİ, Ar. Gör. Erkan CİVELEK, Ecz. Nurdan DAĞTEKİN, Ecz. Kübra AKYEL’e ve Erdal DOĞAN’a,

Doktora eğitimim boyunca “2211-A Genel Yurt İçi Doktora Bursu” ve “2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu” programları ile beni destekleyen TÜBİTAK’a,

Son olarak yaşamımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım boyunca da destek ve ilgileri, sabır ve anlayışları ile her zaman yanımda olan Biricik Ailem’e,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

BAP Proje Numarası: TDK-2018-29789 ve TÜBİTAK Proje Numarası: 115S196

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	3
BEYAN.....	4
İTHAF.....	5
TEŞEKKÜR.....	7
İÇİNDEKİLER	8
TABLolar LİSTESİ.....	12
ŞEKİLLER LİSTESİ	13
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	16
ÖZET	20
ABSTRACT.....	21
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	22
2. GENEL BİLGİLER	25
2.1. Vasküler Tonüsün Regülasyonu	25
2.2. Vazokonstriksiyon Oluşturan Mekanizmalar	29
2.2.1. Hücre İçi Kalsiyum Düzeyinin Arttırılması.....	29
2.2.1.1. Hücre İçi Ca^{2+} Depoları	29
2.2.1.2. Ca^{2+} kanalları.....	30
2.2.1.3. Cl^{-} kanalları	31
2.2.2. Kalsiyum Duyarlılaşması.....	32
2.2.2.1. MP enziminin inhibisyonu	33
2.2.3. Kalsiyum Duyarlılaşmasına Aracılık Eden Hücresel Yolaklar.....	34
2.2.3.1. RhoA/Rho Kinaz.....	34
2.2.3.2. Araşidonik asit	36
2.2.3.3. Protein kinaz C.....	36
2.2.3.4. Tirozin kinaz ve Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz	37
2.3. Vazodilatasyon Oluşturan Mekanizmalar.....	39
2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Düzeyinin Azaltılması	39
2.3.2. Siklik Nükleotidler.....	40
2.3.3. Potasyum Kanalları	41
2.3.4. Ca^{2+} /Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II (CaMKII)	42
2.4. Hidrojen Sülfür (H_2S)	42

2.4.1. Genel Özellikleri ve H ₂ S Donörleri	42
2.4.2. H ₂ S'in Sentezi	44
2.4.3. H ₂ S'i Sentezleyen Enzimlerin Dağılımı	46
2.5. H ₂ S'in Biyolojik Önemi ve Terapötik Potansiyeli.....	47
2.6. H ₂ S'in Vasküler Etkileri	48
2.6.1. H ₂ S'in Vazodilatör Etkisi.....	48
2.6.2. H ₂ S'in Vazokonstriktör Etkisi	49
2.7. H ₂ S'in Vasküler Etkileri ile İlişkili Mekanizmalar.....	50
2.7.1. Potasyum Kanallarının Aktivasyonu	50
2.7.2. eNOS/cGMP/PKG Yolağının Düzenlenmesi	51
2.7.3. NO-CO-H ₂ S Etkileşimi ve Damar Endoteli.....	52
2.7.4. Sitokrom C Oksidaz İnhibisyonu	54
2.7.5. H ₂ S – Perivasküler Adipoz Doku İlişkisi.....	54
2.7.6. Diğer Mekanizmalar	55
2.8. H ₂ S'in Damar Tonüsü Üzerine Indirekt Etkileri	56
2.9. Gözün Anatomisi	56
2.9.1. Retinal Arter ile Retinanın Yapısal ve Fizyolojik Özellikleri.....	58
2.9.2. Retinal Sirkülasyonun Düzenlenmesi	61
2.10. H ₂ S'in Retinadaki Sentezi ve Retinal Hastalıklardaki Rolü	63
2.11. H ₂ S ve Ca ²⁺ Duyarlılaşması Arasındaki İlişki	65
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	68
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	68
3.1.1. Cihazlar	68
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları	69
3.1.3. Laboratuvar Malzemeleri	72
3.1.4. Kullanılan Bilgisayar Yazılım Programları	72
3.2. Kullanılan Yöntemler ve Deney Protokolleri	72
3.2.1. Myograf Sisteminde NaHS'in Retinal Arter Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	72
3.2.1.1. Retinal Arterin İzolasyonu ve Standardizasyonu	72
3.2.1.2. NaHS'in Etki Mekanizmasının İncelenmesi	73
3.2.2. Western Blot Yöntemi ile Kalsiyum Duyarlılaşması ile İlişkili Yolaklara Ait Protein Düzeylerinin Ölçülmesi.....	75

3.2.3. ELISA Yöntemi ile H ₂ S'i Sentezleyen Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi	76
3.2.4. İmmüno Floresans Mikroskopik Analiz ile H ₂ S'i Sentezleyen Enzimlerin Gösterilmesi	77
3.3. İstatistiksel Analiz.....	79
4. BULGULAR.....	80
4.1. NaHS'in Sığır Retinal Arterini Gevşetici Etkisinde Ekstraselüler Kalsiyumun Rolünün Değerlendirilmesi.....	80
4.2. NaHS'in Retinal Arteri Gevşetici Etkisinde Kalsiyum Duyarlılaşması ile İlgili Mekanizmalar	84
4.2.1. MHZK Yolağının Rolünün İncelenmesi.....	84
4.2.2. PKC Yolağının Rolünün İncelenmesi.....	85
4.2.3. Rho Kinaz Yolağının Rolünün İncelenmesi	86
4.2.4. Tirozin Kinaz Yolağının Rolünün İncelenmesi	86
4.2.5. Myozin Fosfataz Yolağının Rolünün İncelenmesi.....	87
4.3. Kalsiyum Duyarlılaşmasına Aracılık Eden Hücrel Yolaklara Ait Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile İncelenmesi	89
4.3.1. RhoA Protein Düzeyleri.....	89
4.3.2. Rho Kinaz Protein Düzeyleri	90
4.3.3. p-MYPT/total MYPT Protein Düzeylerinin İncelenmesi	91
4.3.4. p- CPI-17/ total CPI-17 Protein Düzeylerinin İncelenmesi	92
4.4. H ₂ S'in Biyosentezinde Rol Alan Enzimlerin Retina ve Retinal Arterdeki Düzeylerinin ELISA ile Değerlendirilmesi	94
4.4.1. 3-MST Enzim Düzeyleri.....	94
4.4.2. CBS Enzim Düzeyleri	95
4.4.3. CSE Enzim Düzeyleri	95
4.5. Retina ve Retinal Arterde CBS ve CSE Enzimlerinin Dağılımının İmmüno Floresans Mikroskopik Analiz ile Değerlendirilmesi	96
4.5.1. CBS Enziminin Dağılımı	96
4.5.2. CSE Enziminin Dağılımı	98
5. TARTIŞMA	101
KAYNAKLAR	113
HAM VERİLER	140
FORMLAR	141
ETİK KURUL KARARI	142

PATENT HAKKI İZNİ	143
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	144
ÖZGEÇMİŞ	145



TABLolar LİSTESİ

Tablo 4-1: $\text{Ca}^{2+}(-)$ ve $\text{Ca}^{2+}(+)$ ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile kastırılan retinal arterlere NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) uygulanması ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları ve pEC_{50} değerleri.....	81
---	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kalsiyum duyarlılaşması sağlayan yolaklar - Hirano (2007)-(A) ile Somlyo ve Somlyo (2003)-(B)'den değiştirilerek.....	38
Şekil 2-2: Retinanın tabakaları (discoveryeye.org)'dan değiştirilerek.....	61
Şekil 4-1: $\text{Ca}^{2+}(+)$ ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile kastırılan sığır retinal arterinde NaHS'in (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) oluşturduğu gevşeme yanıtını gösteren orjinal trase.....	80
Şekil 4-2: $\text{Ca}^{2+}(-)$ ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile kastırılan sığır retinal arterinde NaHS'in (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) oluşturduğu gevşeme yanıtını gösteren orjinal trase.....	81
Şekil 4-3: CaCl_2 (10^{-2}M) ile kastırılan retinal arterde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) uygulaması ile elde edilen konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtını gösteren orjinal trase.....	82
Şekil 4-4: A) İzole sığır retinal arterlerinin NaHS ($3 \times 10^{-3}\text{M}$, 20 dk) ile inkübasyonunun CaCl_2 (10^{-5} - 10^{-2}M) ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine etkisi, $n=11$; $p<0.05$. B) NaHS inkübasyonu ile CaCl_2 kasılmalarında elde edilen inhibitor etkiyi gösteren orjinal trase.....	83
Şekil 4-5: MHZK inhibitörü ML-9 inkübasyonunun (10^{-5}M , 20 dk), $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile kastırılan retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi, $n = 10$; $p > 0.05$	84
Şekil 4-6: PKC inhibitörü Calphostin-C inkübasyonunun (10^{-6}M , 20 dk), $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile kastırılan retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi, $n = 8$; $p > 0.05$	85
Şekil 4-7: Rho kinaz inhibitörü Y-27632 ile inkübasyonun (10^{-6}M , 20 dk), $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile kastırılan retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi, $n = 7$; $p > 0.05$	86
Şekil 4-8: Tirozin kinaz inhibitörü Tyrphostin 23 ile inkübasyonun (10^{-4}M , 20 dk), $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile kastırılan retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi, $n = 8$; $p > 0.05$	87
Şekil 4-9: A) MP inhibitörü Calyculin A ile inkübasyonun (10^{-7}M , 20 dk), retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi, B) Calyculin A'nın NaHS'in gevşeme yanıtları üzerindeki etkisini gösteren orjinal trase, $n = 7$; $p < 0.0001$ kontrole kıyasla.....	88

Şekil 4-10: Sığır retinal arterinde RhoA protein düzeylerinin kontrol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ and $\text{PGF}_{2\alpha}+\text{NaHS}$ gruplarında relatif yoğunluk hesaplaması ile gösterimi $n=3, p<0.05$	90
Şekil 4-11: Rho kinaz enziminin protein düzeylerinin kontrol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve $\text{PGF}_{2\alpha}+\text{NaHS}$ gruplarında relatif yoğunluk hesaplaması ile gösterimi, $n = 3, p<0.05$	91
Şekil 4-12: p-MYPT/total MYPT protein düzeylerinin kontrol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve $\text{PGF}_{2\alpha}+\text{NaHS}$ gruplarında relatif yoğunluk hesaplaması ile gösterimi $n=3, p<0.05$	92
Şekil 4-13: p-CPI-17/total CPI-17 protein düzeylerinin kontrol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve $\text{PGF}_{2\alpha}+\text{NaHS}$ gruplarında relatif yoğunluk hesaplaması ile gösterimi $n=3, p>0.05$	93
Şekil 4-14: Western blot analizinde, retinal arterin protein ekstraktlarından elde edilen RhoA, Rho kinaz, p-MYPT, total MYPT, p-CPI-17, total CPI-17 ve internal kontrol β -aktin proteinlerinin kontrol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve $\text{PGF}_{2\alpha}+\text{NaHS}$ gruplarında gözlenen bantları.....	94
Şekil 4-15: Retina ve retinal arterde 3-MST, CBS ve CSE enzimlerinin ELISA ile ölçülen düzeyleri (pg/mg doku).....	95
Şekil 4-16: CBS enziminin retinanın çomak ile koni hücrelerindeki ve retinal arterdeki dağılımı, büyütme oranı 10x.....	96
Şekil 4-17: CBS enziminin, retinanın çomak ile koni hücrelerindeki dağılımı, büyütme oranı 20x.....	97
Şekil 4-18: CBS enziminin, retinal arterin düz kas tabakasındaki ve retinanın gangliyon hücre tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 20x.....	97
Şekil 4-19: CBS enziminin, retinal arterin endotel ve düz kas tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 40x.....	98
Şekil 4-20: CSE enziminin, retinanın çomak ile koni hücrelerinde ve gangliyon hücre tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 10x.....	98
Şekil 4-21: CSE enziminin, retina ve retinal arterdeki dağılımı, büyütme oranı 10x....	99
Şekil 4-22: CSE enziminin, retinal arterin endotel tabakasındaki ve retinanın gangliyon hücre tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 20x.....	99
Şekil 4-23: CSE enziminin, retinanın gangliyon ve bipolar hücre tabakalarındaki dağılımı, büyütme oranı 20x.....	100

Şekil 4-24: CSE enziminin, retinal arterin endotel tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 40x.....100



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

3-MST: 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz

A-II:Anjiyotensin II

AA: Araşidonik asit

AC: Adenilat siklaz

ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim

ADRF: Adiposit kaynaklı gevşetici faktör

AMD: Yaşla ilişkili makula dejenerasyonu

ANP: Atrial natriüretik peptid

AOAA: Amino-oksiasetik asit

ATPaz: Adenozin trifosfataz

BK: Büyük kondüktanslı K_{Ca}

Ca^{2+} : Kalsiyum

Ca_v : Voltaj aracılı Ca^{2+} kanalları

$[Ca^{2+}]$: Ca^{2+} konsantrasyonu

CaM: Kalmodulin

CaMKII: Ca^{2+} /Kalmodulin bağımlı protein kinaz II

cAMP: Siklik adenozin 3',5'-monofosfat

CAT: Sistein aminotransferaz

CBS: Sistasyonin β -sentaz

cGMP: Siklik guanozin 3',5'-monofosfat

CGRP: Kalsitonin gen ilişkili peptid

CICR: Ca^{2+} ile indüklenen Ca^{2+} serbestleşmesi

CIF: Ca^{2+} influks faktör

Cl^- : Klor

Cl_{Ca} : Ca^{2+} bağımlı Cl^- kanalları

Cl_v : Hacim bağımlı Cl^- kanalları

CNP: C-tipi natriüretik peptid

CO: Karbon monoksit

COX: Siklooksijenaz

CPI-17: Protein tip 1 fosfatazın inhibitör proteini

CSE: Sistasyonin γ -liyaz

DAG: Diaçilgliserol
DATS: Diallil trisülfid
DL-PAG: DL-Proparjilglisin
DR: Diyabetik retinopati
EDHF: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz
ET-1: Endotelin-1
GABA: Gama amino butirik asit
GEF: Guanin nükleotid değişim faktörleri
H⁺: Hidrojen iyonu
H₂O₂: Hidrojen peroksit
H₂S: Hidrojen sulfur
HO-1: Hemoksijenaz-1
IK: Orta kondüktanslı K_{Ca}
ILK: İntegrin ilişkili kinaz
IMA: İnternal mamaryal arter
IP₃: İnozitol trifosfat
IRS-1: İnsülin reseptör substrat-1
iNOS: İndüklenebilir NOS
K⁺: Potasyum kanalları
K_{ATP}: ATP duyarlı K⁺ kanalları
K_{Ca}: Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ kanalları
K_{ir}: İçer akım K⁺ kanalları
K_v: Voltaj bağımlı K⁺ kanalları
M20: fonksiyonu bilinmeyen subünite
MAPK: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MHZK: Myozin hafif zincir kinaz
MLC₂₀: Myozin hafif zincir
MP: Myozin fosfataz
MYPT1: Myozin fosfataz hedef subünite
NaHS: Sodyum hidrosülfid
NCX: Na⁺/Ca²⁺ iyon değiştirici pompa
NF-κB: Nükleer faktör kappa b

NO: Nitrik oksid
NSCC: Non selektif katyon kanalları
ONL: Dış nükleer tabaka
OPL: Dış pleksiform tabaka
PAK: p-21 ile aktive edilmiş protein kinaz
PDE: Fosfodiesteraz enzimi
PI₃K: Fosfatidil inozitol 3-kinaz
PIP₂: Fosfatidil inozitol 4,5-bisfosfat
PKA: Protein kinaz A
PKC: Protein kinaz C
PKG: Protein kinaz G
PKN: Protein kinaz N
PLA₂: Fosfolipaz A₂
PLC: Fosfolipaz C
PLD: Fosfolipaz D
PLP: Piridoksal-5-fosfat
PMCA: Plazma membran Ca²⁺-ATPaz pompası
PP1c: Protein tip 1 fosfataz
PS: Fosfatidilserin
PVAT: Periadventisyal adipoz doku
RAO: Retinal arter oklüzyonu
RAS: Renin-anjiyotensin sistemi
RGC: Retinal gangliyon hücreleri
ROCC: Reseptör aracılı Ca²⁺ kanalları
RP: Retinitis pigmentosa
RPE: retinal pigment epitel
RRF: Retinal gevşetici faktör
RVO: Retinal ven oklüzyonu
SERCA: sarkoplazmik retikulum Ca²⁺-ATPaz pompası
sGC: Soluble-çözünebilir guanilat siklaz
SK: Küçük kondüktanslı K_{Ca}
SNP: Sodyum nitroprussiyat
SOCC: Depo aracılı Ca²⁺ kanalları

SR: Sarkoplazmik retikulum

TRP: Geçici reseptör potansiyeli Ca^{2+} kanalları

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VIP: Vazoaktif intestinal peptid

VOCC: Voltaj aracılı Ca^{2+} kanalları



ÖZET

Toprak, A. (2019). Hidrojen Sülfürün Sığır Retinal Arterini Gevşetici Etkisinde Kalsiyum Duyarlılaştırıcı Mekanizmaların ve Sentezinden Sorumlu Enzimlerin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Hidrojen sülfür (H_2S) oküler dokularda eksprese olan ve oküler damarların tonüsünü düzenleyen bir gazotransmitterdir. H_2S donörü NaHS sığır retinal arterinde Kv ve Kir kanallarını kısmen aktive ederek vazodilatasyona neden olur. Çalışmamızda NaHS'in sığır retinal arterini gevşetici etkisinde ekstraselüler Ca^{2+} 'un, Ca^{2+} duyarlılaşmasının rolünü ve olası etki mekanizmalarını incelemeyi amaçladık. Ayrıca, H_2S 'in sentezinden sorumlu enzimlerin (sistasyonin beta sentaz-CBS, sistasyonin gama liyaz-CSE, 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz-3-MST) düzeylerini ve dağılımlarını (CBS, CSE) retina ve retinal arterde belirlemeyi hedefledik. Ekstraselüler Ca^{2+} 'un rolü kalsiyumsuz ortamda $CaCl_2$ veya $PGF_{2\alpha}$ ile kastırılan arterlerde, Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan yolakların rolü ise bu yolakların spesifik inhibitörleri varlığında incelenmiştir. Ca^{2+} duyarlılaşma mekanizmalarında rol oynayan RhoA/Rho kinaz, myozin fosfataz (MP) enzimlerinin ve protein tip 1 fosfatazın inhibitör proteini (CPI-17)'nin protein düzeyleri Western blot yöntemiyle araştırılmıştır. H_2S sentezleyen enzimlerin retinadaki ve retinal arterdeki varlığını, miktarını ve dağılımlarını belirlemek amacıyla ise ELISA ve immünofloresans mikroskopik analizler yapılmıştır. Bulgularımız NaHS'in retinal arter üzerine gevşetici etkisinde ekstraselüler Ca^{2+} , myozin hafif zincir kinaz, protein kinaz C, tirozin kinaz, RhoA/Rho kinaz ve CPI-17'nin rolünün olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte NaHS'in gevşetici etkisinin MP inhibitörü calyculin A varlığında kontrole kıyasla anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Damarların $PGF_{2\alpha}$ +NaHS ile inkübasyonu MP'nin MYPT1 subünitesinin fosforilasyon düzeylerinin kontrol ve sadece $PGF_{2\alpha}$ ile inkübe damarlarla kıyaslandığında azaldığını göstermiştir. Bunlara ek olarak CSE başta olmak üzere, her üç enzimin de retina ve retinal arterde varlığı ve retinal arterdeki miktarlarının retinaya göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, CBS'nin retinal arterin endotel ve düz kas tabakasında, CSE'nin ise endotelde yerleşim gösterdiği görülmüştür. Retinadaki dağılım açısından ise CBS ile CSE'nin koni-çomak hücreleri ve retinal gangliyon hücrelerinde bulunduğu, ek olarak CSE'nin bipolar hücrelerde de bulunduğu gözlenmiştir. Bulgularımız NaHS'in gevşetici etkisinden sorumlu mekanizmanın temel olarak MP aktivasyonu olduğuna ve H_2S 'in retina ve retinal arterde endojen olarak sentezlendiğine işaret etmektedir. H_2S 'in retinal arterdeki varlığını ve vasküler tonüse katkısını ortaya koyduğumuz çalışmamız, H_2S 'in retinal vasküler hastalıklarda koruyucu veya terapötik etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hidrojen sülfür, Ca^{2+} duyarlılaşması, retinal arter, retina, vazodilatasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

BAP Proje Numarası: TDK-2018-29789 ve TÜBİTAK Proje No: 115S196

ABSTRACT

Toprak, A. (2019). Investigation of Calcium Sensitizing Mechanisms of Hydrogen Sulfide in Relaxing Effect of Bovine Retinal Artery and Enzymes Responsible for Synthesis of Hydrogen Sulfide. İstanbul University, Institute of Health Science, Faculty of Pharmacy Department of Pharmacology. PhD Thesis. İstanbul.

Hydrogen sulfide (H_2S) is a gasotransmitter expressed in ocular tissues and involved in regulation of ocular vascular tone. NaHS, a H_2S donor, induces vasodilation in bovine retinal artery partially via Kv and Kir channel activation. In this study we aimed to investigate the role of extracellular Ca^{2+} , Ca^{2+} sensitization and the possible mechanisms and also to determine the levels of the enzymes responsible for the synthesis of H_2S (cystathionine beta synthase-CBS, cystathionine gamma lyase-CSE, 3-mercapturuvate sulphidetransferase-3-MST) and distributions (CBS, CSE) in retina and retinal artery. The role of extracellular Ca^{2+} was assessed at $CaCl_2$ or $PGF_{2\alpha}$ precontracted arteries in the absence of Ca^{2+} , the role of Ca^{2+} sensitization pathways were investigated in the presence of specific inhibitors. The protein levels of RhoA / Rho kinase, myosin phosphatase (MP) enzymes and protein-type 1 phosphatase inhibitor protein CPI-17, which have role in Ca^{2+} sensitization mechanisms were investigated by Western blot. ELISA and immunofluorescence microscopic analyzes were performed to determine the presence, amount and distribution of the enzymes that synthesized H_2S in the retina and retinal artery. As a result, it is shown that extracellular Ca^{2+} , myosin light chain kinase, protein kinase C, tyrosine kinase, RhoA/Rho kinase and CPI-17 did not play a role in the vasodilator effect of NaHS. Additionally, incubation with MP inhibitor significantly reduced the relaxation effect of NaHS. Incubation of the arteries with $PGF_{2\alpha}$ + NaHS showed that the MYPT1 subunit of MP phosphorylation levels reduced significantly compared to the control and only $PGF_{2\alpha}$ incubated arteries. Besides, the presence of all three enzymes, particularly CSE, were found in retina and retinal artery and they were found to be higher in retinal artery than the retina. Moreover, CBS was shown to be present in the endothelial and smooth muscle layer of the retinal artery whereas, CSE in the endothelium. In terms of distribution, in the retina, CBS and CSE were found in cone-basal cells and retinal ganglion cells, besides, CSE radiating in bipolar cells. Our findings suggest that the mechanism responsible for the relaxation effect of NaHS is mainly MP activation and that H_2S is synthesized endogenously in the retina and retinal artery. Our study, showing the presence of H_2S in retinal artery and its contribution to vascular tone proposes that H_2S may have protective or therapeutic effects in retinal vascular diseases.

Key Words: Hydrogen sulfide, Ca^{2+} sensitization, retinal artery, retina, vasodilation.

This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of İstanbul University and TUBITAK.

BAP Project Number: TDK-2018-29789 and TUBITAK Project Number: 115S196.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanı doku ve organlara taşıyan damarlar; tunica adventitia (dış tabaka), tunica media (orta tabaka-düz kas) ve tunica intima (iç tabaka-endotel) olmak üzere üç katmandan oluşur. Bu tabakalardan düz kas ve endotel, damar tonüsünün düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Vasküler tonüs damar düz kas tabakasının istirahat halindeki kasılma cevaplılığı olup kan akımını belirleyen önemli bir parametredir. Vasküler tonüs damarın kasılma ve gevşeme yanıtları arasındaki dengeye göre oluşur. Genel olarak Ca^{2+} konsantrasyonundaki artış vazokonstriksiyona, azalma ise vazodilatasyona katkı sağlar (Jackson 2000; Loh ve ark. 2018). Kasılmanın oluşması için kontraktıl proteinler olan aktin ve myozin filametlerinin kenetlenmesi gereklidir. Bu fizyolojik süreci başlatan genellikle hücre içi Ca^{2+} düzeyindeki değişikliklerdir. Damar vazokonstriktör maddelerle uyarıldığında sitozolik Ca^{2+} miktarı artar. Artan Ca^{2+} kalmoduline (CaM) bağlanır. Ca^{2+} -CaM kompleksi myozin hafif zincir kinaz (MHZK) enzimini aktive eder. Aktifleşen MHZK, myozin hafif zincirini (MLC_{20}) fosforile edip kontraktıl filamentlerin kenetlenmesini sağlayarak vazokonstriksiyon oluşturur. Diğer yandan, sitozolik Ca^{2+} düzeyleri azaldığında CaM, MHZK'dan ayrılır ve MHZK inaktif olur. Bu durumda myozin fosfataz (MP) enzimi Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak aktifleşir, MLC_{20} 'yi defosforile eder. Böylelikle aktin ve myozin filamentleri birbirinden ayrılır ve vazodilatasyon meydana gelir (Akata 2007a; Kuo ve Ehrlich 2015). Kontraktıl agonistlerin reseptörleri uyarması sonucunda, Ca^{2+} konsantrasyonu sabit olsa da, kasılma kuvveti artabilir. Bunun nedeni MLC_{20} 'nin fosforilasyonundaki artışın yanı sıra, MP enziminin inhibe olmasıdır. MP inhibe olduğunda MLC_{20} 'nin defosforilasyonu engellenir ve kasılma yanıtı potansiyalize edilir. Bu şekilde Ca^{2+} konsantrasyonundan bağımsız olarak, MP modülasyonu ile vazokonstriksiyona katkıda bulunulmasına Ca^{2+} duyarlılaşması denir. (Akata 2007b). RhoA/Rho kinaz, protein kinaz C (PKC), tirozin kinaz, CPI-17 fosforilasyonu Ca^{2+} duyarlılaşmasını sağlayan yollardandır (Hirano ve ark. 2004).

Vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon oluşturarak vasküler tonüsü düzenleyen sistemik ve lokal faktörler bulunmaktadır. Sistemik regülasyonda sempatik sinir sistemi ve renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin (RAAS) aktif rolü varken; lokal regülasyonu düz kas hücrelerinde bulunan iyon kanalları ile endotel tabakasından ve perivasküler adipoz dokudan (PVAT) serbestlenen vazokonstriktör ve vazodilatör etkili

maddeler sağlamaktadır (Golan 2012; Loh ve ark. 2018). Endotel kaynaklı vazokonstriktör maddelere endotelin-1 (ET-1), anjiyotensin II (A-II) ve tromboksan (TXA₂); vazodilatör maddelere ise nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI₂), endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) ve hidrojen sülfür (H₂S) örnek verilebilir. (Zaborska ve ark. 2017; Loh ve ark. 2018). Vasküler tonüsün lokal faktörler ile düzenlenmesi, özellikle sistemik regülasyonu olmayan yapılarda önemlidir. Örneğin gözün retina tabakasının dolaşım sisteminde otonomik, kolinerjik ve purinerjik sistemlerin innervasyonu olmadığından; retinal dolaşımında görevli retinal arter gibi damarların tonüsünün düzenlenmesinde lokal faktörler çok önemlidir. Retinal arter tonüsünün düzenlenmesini sağlayan faktörlere NO, prostaglandinler, ET-1, adenosin, retinal gevşetici faktör (RRF) ve H₂S örnek olarak gösterilebilir (Daele ve ark. 2017).

H₂S, memelilerde endojen olarak sistatyonin γ -liyaz (CSE), sistatyonin β -sentaz (CBS), sistein aminotransferaz (CAT)/3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz enzimleri ile sentezlenen bir gazotransmitterdir (Dongo ve ark. 2018). Genel olarak, hücre içi Ca²⁺ artışı ile endotelde CSE aracılı sentezi artan H₂S'in, damar düz kaslarındaki potasyum (K⁺) kanallarını aktive ederek gevşeme yanıtına katkı sağladığı bilinmektedir (Loh ve ark. 2018). Kardiyovasküler sistem ve santral sinir sisteminde rolü olduğu bilinen H₂S, oküler sistemde de büyük öneme sahiptir. H₂S'in oküler sistemlerdeki rolünü inceleyen çalışmalar diğer sistemlere kıyasla daha azdır. H₂S'i sentezleyen enzimlerden CBS'nin semender retinasında, domuz ve insan gözünde eksprese olduğunu; CSE'nin ise semender ve fare retinasında bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Persa ve ark. 2006; Pong ve ark. 2007). Ayrıca, H₂S'in kornea ve retinada en fazla olmak koşuluyla sığır gözünde bulunduğu bildirilmiştir (Kulkarni ve ark. 2011). Gözde H₂S'in varlığına ve endojen olarak sentezine işaret eden çalışmaların yanında, H₂S'in oküler damarların tonüsünün regülasyonundaki rolünü gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. H₂S donörü GYY4137'in sığır siliyer arterini kısmen K_{ATP} kanal aktivasyonu ile (Chitnis ve ark. 2013), H₂S donörü AP67 ve AP72'nin sığır siliyer arterini endojen H₂S, NO ve K_{ATP} kanal aktivasyonu aracılığıyla (Kulkarni-Chitnis ve ark. 2015) gevşettiği bildirilmiştir. Ayrıca, GYY4137 ve NaHS'in domuz retinal arterinde vazodilatör etkili olduğu ve domuz retinal arterinde gevşemeye yol açan perivasküler retina ile hipoksinin gevşetici etkisinin mekanizmasında H₂S'in rol oynadığı rapor edilmiştir (Winther ve ark. 2015). Bunlara ek olarak biz de önceki çalışmamızda H₂S donörü NaHS'in sığır retinal arterini endotelden, guanilat/adenilat siklazdan, L-tipi Ca²⁺ kanalından bağımsız;

kısmen Kv ve Kir kanallarının aktivasyonuna bağılı olarak gevşettiğini gösterdik (Takır ve ark. 2015a). Önceki çalışmamızda elde edilen veriler NaHS'in sıgır retinal arterini gevşetici etkisinde; hiperpolarizasyona neden olarak voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını (VOCC) inhibe eden ve hücre içi Ca^{2+} miktarını azaltan K^+ kanallarının rolünü ortaya koymuştur. Ayrıca, retinal arterdeki L-tipi voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının blokajının NaHS'in gevşetici etkisini değıştirmediğini göstermiştir. Bu veriler, NaHS'in retinal arterdeki gevşetici etkisinde Ca^{2+} 'dan bağımsız mekanizmaların rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

H_2S ve Ca^{2+} duyarlılaşması arasındaki ilişkiyi inceleyen fazla çalışma yoktur. H_2S 'in fare gastrik fundusunda Rho kinazdan bağımsız, kısmen MP aktivasyonuna ile (Dhaese ve Lefebvre 2009); fare distal kolon kaslarında Ca^{2+} duyarsızlaşmasına yol açarak (Dhaese ve ark. 2010), tavşan mide düz kaslarında ise Rho kinaz ve PKC inhibisyonu ile (Nalli ve ark. 2015) gevşetici etki gösterdiği bildirilmiştir. H_2S 'in sıçan koroner arterindeki vazokonstriktör etkisinin araştırıldığı çalışmada ise etkiden sorumlu mekanizmaların ekstraselüler kalsiyum ve RhoA/Rho kinaz olduğu rapor edilmiştir (Ping ve ark. 2015). Bu alanda var olan çalışmalar sadece damar dışı düz kaslarda ve H_2S 'in vazokonstriktör etkili olduğu bir damar yatağında yapılmıştır. Bu verilerden hareketle, çalışmamızda NaHS'in sıgır retinal arterini gevşetici etkisinin mekanizmasında Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan yolların rolünü araştırmayı hedefledik. Literatürde, H_2S 'in damarlardaki gevşetici etkisinin araştırıldığı çalışmalarda Ca^{2+} duyarlılaşması ile ilgili yolları inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Tez çalışmamız, H_2S 'in vazodilatör etkisi ve Ca^{2+} duyarlılaşması arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışma olduğu için özgün değere sahiptir ve bu alandaki literatüre önemli katkı sağlayacaktır. Tez çalışmamızda NaHS'in sıgır retinal arterini gevşetici etkisinde kalsiyum duyarlılaşmasının rolünü ve olası mekanizmalarını (MHZK, RhoA/Rho kinaz, PKC, tirozin kinaz, MP, CPI-17) incelemeyi ve ayrıca, H_2S 'in sentezinden sorumlu enzimlerin (CBS, CSE, 3-MST) düzeylerini ve dağılımlarını (CBS, CSE) retina ve retinal arterde belirlemeyi hedefledik. H_2S 'in retina ve retinal arterdeki biyolojik rolü ile retinal nöronlarda veya görme fonksiyonunda hasara yol açan retinal arter oklüzyonu, retinal ven oklüzyonu veya diyabetik retinopati gibi retinal damar hastalıklarındaki terapötik potansiyeli değerlendirildiğinde; çalışmamızla elde edilecek verilerin bu alanlardaki çalışmalara ışık tutacağı ve retinal vasküler hastalıkların tedavisine yeni bir yaklaşım ile sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vasküler Tonüsün Regülasyonu

Vasküler tonüs, damar düz kas tabakasının aktivitesi olup sistemik dolaşımdaki kan akımını belirleyen önemli bir parametredir. Düz kas tabakasındaki kontraktıl durumun düzenlenmesinde rol oynayan birçok vazokonstriktör (damar kastırıcı) ve vazodilatör (damar gevşetici) uyarıcı vardır. Bu uyarıcılar dolaşımdaki hormonlar, nörotransmitterler, endotel tabakasından salınan vazoaftif maddeler ve kan basıncı olmak üzere dört başlık altında toplanabilir. Bunlar damarın kontraktıl aktivitesini düzenlerken, aynı zamanda damar çapının ve direncinin değişimine de katkıda bulunurlar (Jackson 2000).

Vasküler tonüsün regülasyonunda görev alan sistemik ve lokal faktörler bulunmaktadır. Sistemik regülasyonda sempatik sinir sistemi ve renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin (RAAS) aktif rolü vardır. Her iki sistem de birbiriyle koordine çalışarak kan basıncını ve vasküler tonüsü modüle edebilmektedir. Bu iki sistemin koordinasyonu, baroreseptör refleks mekanizma ile gerçekleşir. Arcus aorta, karotid arter ve böbrekteki jukstaglomerüler hücrelerde bulunan baroreseptörler, basınç değişikliğini algılayan sensörlerdir. Damarlarda bulunan baroreseptörler aracılığıyla algılanan düşük basınç beyin sapındaki vazomotor merkeze iletilir ve sempatik sistem aktif hale gelir. Bu aktivasyon sonucunda sempatik sistem damarda α_1 reseptörleri aracılığıyla vazokonstriksiyona, kalpteki β_1 reseptörleri aracılığıyla kalbin kasılma kuvvetinde artışa neden olarak kan basıncını yükseltir. Jukstaglomerüler hücrelerde bulunan baroreseptörler ise algıladıkları düşük basıncı beyinde hipotalamusa ileterek, aldosteron salgısını uyarırlar. Aldosteron böbreklerden su ve sodyum geri emilimini artırır. Böylece artan intravasküler hacim kan basıncını yükseltir (Golan 2012).

Bunlara ek olarak, sempatik sistem jukstaglomerüler hücrelerdeki β_1 reseptörleri aracılığıyla renin salgısını uyarır. Renin, RAAS'ı aktive eden; anjiyotensinojenden anjiyotensin I oluşumunu sağlayan bir enzimdir. RAAS'ın ikinci kısmını oluşturan Anjiyotensin II ise, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aracılığıyla anjiyotensin I'den dönüştürülür. Anjiyotensin II, damar düz kas hücrelerinde bulunan anjiyotensin II reseptörlerine bağlanarak vazokonstriksiyon sağlar. Ayrıca adrenal korteksten

aldosteron salgılanmasını uyararak da kan basıncının yükselmesine katkıda bulunur (Golan 2012).

Vasküler tonüsü düzenleyen lokal faktörler ise düz kas hücrelerinde bulunan iyon kanalları ile endotel tabakasından ve perivasküler adipoz dokudan (PVAT) kaynaklanan vazoaaktif maddeler olarak tanımlanabilir. Düz kas hücrelerinde eksprese olan kalsiyum (Ca^{2+}) kanalları vazokonstriksiyona, potasyum (K^+) kanalları da vazodilatasyona aracılık ederek vasküler tonüse katkı sağlarlar. Damarın iç kısımdaki tabakası olan endotel tabakası, vazokonstriktör ve vazodilatör maddeleri barındırması nedeniyle fizyolojik öneme sahiptir. Endotel tabakasının yanı sıra PVAT'ın da salıverdiği çeşitli adipokinler aracılığı ile damar düz kas tonüsüne katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Endotel tabakası ve PVAT kaynaklı vazoaaktif faktörler kastırıcı ya da gevşetici etkileri ile damar düz tonüsünün parakrin regülasyonunu sağlarlar (Loh ve ark. 2018).

Endotel kaynaklı vazokonstriktör maddelere endotelin-1 (ET-1), anjiyotensin II (A-II) ve tromboksan (TXA_2) örnek gösterilebilir. Bu maddeler sırasıyla, damar düz kas hücrelerinde bulunan $\text{G}_{\text{q}\alpha}$ kenetli ET-A, A-II ve TXA_2 reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. $\text{G}_{\text{q}\alpha}$ reseptör sinyalizasyonunda fosfolipaz C (PLC) enzimi aracılığıyla IP_3 (inozitol trifosfat) ve DAG (diasilgliserol) ikincil habercileri oluşur. Her 2 molekül de hücre içi Ca^{2+} miktarını arttırarak vazokonstriksiyona katkıda bulunurken; PKC aynı zamanda aktin ve myozin filametlerinin Ca^{2+} 'a duyarlılaşmasını arttırmak suretiyle de kasılma yanıtını potansiyalize edebilir (Zaborska ve ark. 2017).

Endotel kaynaklı gevşetici faktörlere ise nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI_2), endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) ve hidrojen sülfür (H_2S) örnek verilebilir (Loh ve ark. 2018).

NO, endotelde sitozolik kalsiyum (Ca^{2+}) miktarının artması ile aktif hale gelen endotelyal NO sentaz (eNOS) enzimi aracılığıyla üretilir. Endotelde sentezlenen NO, damar düz kas hücrelerine difüze olarak hücre içi sinyalizasyonu başlatır. Öncelikle soluble (çözünür) guanilat siklaz (sGC) aktive olur. Bu aktivasyon siklik guanozin monofosfat (cGMP) ikincil habercisinin oluşumunu arttırır. Artan cGMP protein kinaz G'yi (PKG) aktifleştirir. PKG, K^+ kanallarını aktive ederek vazodilatasyon meydana getirir (Loh ve ark. 2018).

PGI₂, damarlarda trombositlerin agregasyonunu önleyen ve vazodilatör etkili olan önemli bir mediatördür. Membran fosfolipidlerinin, fosfolipaz A₂ (PLA₂) veya diaçilgliserol (DAG) lipaz enzimleri aracılığıyla yıkımı sonucu oluşan araşidonik asitten (AA) sentezlenir. AA oluşumunda görevli enzim ise siklooksijenazdır (COX). Endotelde sentezlenen PGI₂ damar düz kas hücrelerindeki prostasiklin reseptörlerine bağlanarak (IP) etki gösterir. Bu reseptörler G-protein kenetli reseptörlerdir (G_{sα}). Bu reseptörlerin stimülasyonu sonucu aktifleşen adenilat siklaz (AC) enzimi siklik adenosin monofosfat (cAMP) ikincil habercisinin oluşumunu artırır. Artan cAMP protein kinaz A'yı (PKA) aktiveleştirir. PKA K⁺ kanallarını aktive ederek vazodilatasyon oluşturur (Loh ve ark. 2018).

EDHF, henüz moleküler yapısı aydınlatılmamış, fakat etki mekanizması ve sentez yeri bilinen bir maddedir. Endotelde sentezlenen bu molekül hücreleri hiperpolarize ederek oluşturduğu elektriksel sinyali düz kas hücrelerine iletir. Düz kasta meydana gelen hiperpolarizasyon ile Ca²⁺ miktarını azaltarak gevşeme yanıtı oluşturur (Loh ve ark. 2018).

EDHF'ye benzer olarak endotelde sentezlenip hiperpolarizasyona neden olan H₂S de vasküler tonüsün düzenlenmesine katkı sağlayan mediyatörlerden biridir. Endoteldeki sentezine aracılık eden başlıca enzim sistatyonin γ-liyaz (CSE) enzimidir. Hücre içi Ca²⁺ artışı ile endotelde sentezi artan H₂S'in, genellikle düz kas tabakasında bulunan potasyum (K⁺) kanallarını aktive ederek gevşeme yanıtına katkı sağladığı bildirilmektedir (Loh ve ark. 2018). H₂S hem aorta gibi kapasitans hem de mezenterik arter gibi rezistans damar yataklarında gevşetici etki oluşturmaktadır. Ayrıca H₂S'in etki mekanizması damar yataklarına göre değişkenlik göstermektedir (Gheibi ve ark. 2018). Damar yatağı ve etki mekanizması çeşitliliğini gösteren çalışma örneklerinde, H₂S ile elde edilen vazodilatör yanıtın mekanizmasının; serebral arterde kısmi olarak voltaj bağımlı Ca²⁺ kanallarının (VOCC) inhibisyonu ile (Streeter ve ark. 2012), mezenterik arterde endotel tabakası ile (Cheng ve ark. 2004); koroner arterde kısmi olarak voltaj bağımlı K⁺ kanalı (K_v) aktivasyonu ile, aortada ATP duyarlı K⁺ kanalı (K_{ATP}) aktivasyonu ile (Zhao ve ark. 2001) ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

Endotelde sentezlenen vazokonstriktör ve vazodilatör maddeler dışında, perivasküler adipoz doku da (PVAT) vasküler tonüsün düzenlenmesine katkıda bulunan önemli faktörlerden birisidir. Birçok damarın etrafında var olan PVAT, aortada ve

mezenterik arterde yoğun olarak bulunsa da; mikrodamarlar ve beyin damarları etrafında bulunmaz (Horman ve ark. 2008; Miao ve Li 2012; Zaborska ve ark. 2017). PVAT adipositler, lenfositler, endotel hücreleri vb. birçok hücre tipini yapısında barındırır. Ayrıca vazoaaktif etkiye sahip, adipokinler olarak adlandırılan proteinleri barındırıp serbestleşmesini sağlayan PVAT endokrin bir organ görevi görür. PVAT'ın vasküler tonüsü düzenleyici etkisi PVAT-kaynaklı gevşetici faktörler ve K^+ kanallarının modülasyonu ile sağlanır. PVAT kaynaklı gevşetici faktörlere örnek olarak NO, H_2S , PGI_2 ve hidrojen peroksit (H_2O_2) verilebilir (Zaborska ve ark. 2017).

Vasküler tonüsün düzenlenmesinde görevli bahsi geçen bu faktörler, temelde iki fizyolojik olayın, vazokonstriksiyon ve vazodilatasyonun gerçekleşmesine aracılık edip bu iki süreç arasındaki dengeyi sağlarlar.

Diğer kaslarda olduğu gibi, damar düz kasındaki kasılma yanıtının (vazokonstriksiyonun) oluşumu hücre içi kalsiyum ($[Ca^{2+}]$) düzeylerinin artmasına bağlıdır. $[Ca^{2+}]$ konsantrasyonundaki artış damarda kasılma, azalma ise gevşeme yanıtının oluşmasına katkıda bulunur. Kasılma esnasında $[Ca^{2+}]$ 'un damar düz kas hücrelerinde artışına aracılık eden iki temel mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan birisi hücre membranında yer alan iyon kanalları, diğeri ise hücre içi Ca^{2+} depolarıdır (Jackson 2000). Damarın vazokonstriktör maddelerce uyarılması sonucunda, membrandaki iyon kanalları aracılığıyla ekstraselüler ortamdan içeri giren ve/veya hücre içi depolardan salıverilen Ca^{2+} , kalmoduline (CaM) bağlanır. 4 tane Ca^{2+} iyonu ile bağlanan kalmodulin molekülünde meydana gelen konformasyonel değişikliği takiben; Ca^{2+} -CaM kompleksi myozin hafif zincir kinaz enzimine (MHZK) bağlanır. Bu bağlanma sonucunda aktifleşen MHZK, myozin hafif zincirini (MLC_{20}) serin19'dan fosforiller ve myozin adenoazin trifosfataz (myozin ATPaz) enziminin aktivasyonuna yol açar. Sonuç olarak, aktin ve myozin proteinleri kenetlenir ve vazokonstriksiyon gerçekleşir. Diğer yandan, plazmalemmal Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPaz aracılığı ile Ca^{2+} 'un hücre dışına çıkışı ve/veya sarkoplazmik/endoplazmik retikulum ATPaz aracılığı ile Ca^{2+} 'un hücre içi depolara alınması ile $[Ca^{2+}]$ düzeyleri azaldığında CaM, MHZK'dan ayrılır ve MHZK aktivitesini kaybeder. Bu durumda myozin fosfataz (MP) enzimi Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak aktifleşir, MLC_{20} 'yi defosforile edip myozin ATPaz enzimini inaktive eder. Böylelikle aktin ve myozin proteinleri birbirinden ayrılır ve vazodilatasyon meydana gelir (Akata 2007a; Kuo ve Ehrlich 2015).

2.2. Vazokonstriksiyon Oluşturan Mekanizmalar

2.2.1. Hücre İçi Kalsiyum Düzeyinin Arttırılması

Damar düz kas hücrelerinin dinlenim durumundaki Ca^{2+} konsantrasyonu $[\text{Ca}^{2+}]$ kasılmayı indükleyecek düzeyde değildir (10^{-7} M). Dinlenim durumunda $[\text{Ca}^{2+}]$ dengesini sağlayan bazı mekanizmalara plazma membranı (plazmalemmal) Ca^{2+} -ATPaz (PMCA), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ iyon değiştiricisi (NCX) ve hücre içinde sarkoplazmik-endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz (SERCA) örnek verilebilir. Kasılmanın başlaması için, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun 10^{-6} M'ı aşması gereklidir. Hücrede $[\text{Ca}^{2+}]$ düzeyleri başlıca iki kaynak aracılığıyla arttırılır. Bu kaynaklar, hücre içi Ca^{2+} depolarından Ca^{2+} 'un çıkışı ve ekstraselüler iyon kanalları ile Ca^{2+} 'un hücre içine taşınmasıdır (Bagur ve Hajnóczky 2017; Ottolini ve ark. 2019).

2.2.1.1. Hücre İçi Ca^{2+} Depoları

Ca^{2+} , damar düz kas hücrelerinde sarkoplazmik-endoplazmik retikulumda (SR) depolanır. Kasılma esnasında SR'den Ca^{2+} 'u, inozitol 1, 4, 5-trifosfat (IP_3) veya doğrudan hücre içi Ca^{2+} düzeyleri serbestleyebilir (Liu ve Khalil 2018). IP_3 , G-protein kenetli reseptörlerin aktivasyonu ile oluşan ikincil haberci bir moleküldür. Noradrenalin, A-II ve ET-1 gibi kontraktıl agonistler G-protein kenetli reseptörlerine bağlanarak reseptörde konformasyonel bir değişim oluştururlar. Bu değişiklik sonucunda α , β , ve γ alt birimlerinden oluşan heterotrimerik yapıdaki reseptörden α alt birimi ayrılarak fosfolipaz C (PLC) enzimini aktif hale getirir. Aktifleşen PLC, fosfatidil inozitol 4,5-bisfosfattan (PIP_2) IP_3 ve diaçilgliserol (DAG) oluşumunu kataliz eder. IP_3 , SR'daki reseptörüne bağlanarak, SR'da depolanan Ca^{2+} 'un sitozole geçmesini sağlar. Böylece, hücre içinde yükselen Ca^{2+} kontraktıl proteinleri aktive eder ve kasılma gerçekleşir (Akata 2007a; Ghosh ve ark. 2017).

Ca^{2+} ile indüklenen Ca^{2+} serbestleşmesi (CICR) ise, SR'nin ryanodin reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşir. Ryanodin reseptörlerinin agonisti Ca^{2+} iyonudur. IP_3 yolağı ile artan Ca^{2+} , CICR'yi uyarır ve sitozolde Ca^{2+} artışı sağlayarak vazokonstriksiyona katkıda bulunur (Ghosh ve ark. 2017; Liu ve Khalil 2018).

2.2.1.2. Ca^{2+} kanalları

Hücre içinde Ca^{2+} düzeylerini arttıran kanallara; voltaj, reseptör, depo aracılı ve geçici reseptör potansiyeli (TRP) Ca^{2+} kanalları örnek olarak verilebilir (Liu ve Khalil 2018).

Membran depolarizasyonu ile aktive olan Ca^{2+} kanallarına voltaj aracılı Ca^{2+} kanalları (voltage operated Ca^{2+} channels-VOCC veya Ca_v) denir. Damarlarda eksprese olan VOCC'lar L-tipi (long lasting-uzun süreli) ve T tipi (transient-geçici) kanallardır. L-tipi VOCC'lar kuvvetli depolarizasyon ile aktive olurlar, inaktivasyonları ise yavaş meydana gelir. T-tipi VOCC'lar ise daha düşük depolarizasyon düzeyleri ile aktifleşip, daha çabuk inaktive olurlar. Damar düz kas hücre membranı depolarize olduğunda VOCC'lar aktive olur. Ekstraselüler alandan hücre içine Ca^{2+} girişini arttırarak damarın kasılmasını sağlarlar (Akata 2007a; Liu ve Khalil 2018; Ottolini ve ark. 2019).

Reseptör aracılı Ca^{2+} kanalları (receptor operated Ca^{2+} channels-ROCC), fizyolojik kontraktıl agonistlerin reseptörlerine bağlanması ile aktive olan, hücre içi Ca^{2+} miktarını arttırarak vazokonstriksiyona katkıda bulunan kanallardır. Reseptör stimülasyonu ile aktive olan kanalların daha çok +2 değerlikli katyonlara selektif olan, non-selektif katyon kanalları (NSCC) olduğu düşünülmektedir. Ancak, NSCC'ler sodyum iyonuna (Na^+) daha fazla geçirgen olduğundan; bu kanallar ile hücre içine giren Ca^{2+} 'un, kasılma yanıtı katkısının zayıf olduğu tahmin edilmektedir. NSCC'ler aracılığıyla hücreye Na^+ girişi olduğunda membran depolarize olur. Depolarizasyon VOCC'ları aktif hale getirir, hücre içi Ca^{2+} düzeyleri artar ve vazokonstriksiyon gerçekleşir. ET-1, noradrenalin, A-II, serotonin vb. agonistler reseptörlerine bağlanıp, non-selektif veya selektif olan katyon kanallarını aktive ederek kasılma yanıtına aracılık edebilirler. ROCC terimi günümüzde çok sık kullanılmamaktadır. ROCC'lar artık geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanallarının bir alt tipi olarak anılmaktadır (Akata 2007a; Martinsen ve ark. 2014; Liu ve Khalil 2018).

Ca^{2+} kanallarının bir alt tipi olan TRP (transient receptor potential-geçici reseptör potansiyeli) kanalları; damar düz kas hücresinde eksprese olan, membran potansiyelinin ve vazokonstriksiyonun düzenlenmesine katkıda bulunan kanallardır. TRP kanalları, rezistans arterlerde G-protein kenetli reseptörlerin stimülasyonu aracılığıyla aktifleşerek kasılma cevabının oluşmasında rol oynar. Kontraktıl agonistler

ile stimüle edilen NSCC'lerin bir çoğu, TRP kanallarının alt tipleridir. Bu kanallar reseptör aracılı aktive olabildiği gibi, $[Ca^{2+}]$ depolarının tükenmesine bağlı olarak da aktifleşebilir. $[Ca^{2+}]$ depolarının Ca^{2+} konstrasyonuna bağlı olarak aktive olan kanallar TRP2, TRP4 ve TRP5 iken; konstrasyondan bağımsız olanlar TRP1, TRP3, TRP6 ve TRP7 kanallarıdır. Bu kanalların aktivasyonu tükenen Ca^{2+} depolarının tekrar dolmasını sağlar. Hücreye Na^+ ve Ca^{2+} girişi sağlayarak, membranı depolarize ederler. Depolarizasyon sonucu aktive olan VOCC'lar aracılığıyla artan $[Ca^{2+}]$, kontraktıl filamentlerin kenetlenerek kasılma cevabını oluşturmaya katkıda bulunur (Walker ve ark. 2001; Akata 2007a, Liu ve Khalil 2018).

Depo aracılı Ca^{2+} kanalları (store-operated Ca^{2+} channels-SOCC) SR'de depolanan Ca^{2+} 'un tükenmesi sonucu aktive olan kanallardır. SR'de $[Ca^{2+}]$ depolarının tükenmesine neden olan olaylara reseptör stimülasyonu ile IP_3 'ün SR'den sitozole Ca^{2+} geçişi sağlaması, CICR aktivasyonu ile SR'den sitozole Ca^{2+} geçişi veya sitozolden SR'ye Ca^{2+} geçişi sağlayan SERCA pompasının inhibisyonu örnek verilebilir. Depoların tükenmesi sonucu, Ca^{2+} influks faktör (Ca^{2+} influx factor-CIF) ismi verilen haberci kimyasal bir maddenin salındığı ve bu faktörün SOCC'ları aktive edip ekstraselüler alandan sitozole Ca^{2+} geçişini arttırarak vasküler tonüsa katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Akata 2007a; Liu ve Khalil 2018).

2.2.1.3. Cl^- kanalları

Klor (Cl^-) kanalları damar düz kas hücrelerinde eksprese olan ve vasküler tonüsün düzenlenmesine katkıda bulunan kanallardır. Ca^{2+} bağımlı (Cl_{Ca}) ve hacimle düzenlenen (Cl_V) Cl^- kanallarının damarlarda eksprese olduğu bilinmektedir (Jackson 2000).

Cl_{Ca} kanalları hücre içi Ca^{2+} düzeyleri arttığında aktifleşir ve hücreden Cl^- çıkışı sağlar. Cl^- çıkışı ile negatif yük kaybeden hücre, pozitif hale geldiği için membran depolarize olur. Depolarizasyon ile hücrede Ca^{2+} artışına katkıda bulunan Cl_{Ca} 'lar damarın kasılma yanıtını potansiyelize ederler (Jackson 2000; Kitamura ve Yamazaki 2001; Akata 2007b).

Cl_V kanalları ise düşük osmotik basıç, mekanik gerim veya yüksek kan basıncı ile damarların gerilmesi sonucu aktifleşebilir. Cl_V aktivasyonu membran

depolarizasyonuna neden olarak VOCC'ları aktive eder ve vazokonstriksiyona katkı sağlar (Akata 2007b).

2.2.2. Kalsiyum Duyarlılaşması

Damar düz kasının kasılması ve gevşemesi MLC_{20} 'nin fosforilasyonu ve defosforilasyonu arasındaki dengeye bağlı olarak gelişir. MLC_{20} 'nin fosforilasyonu MHZK, defosforilasyonu ise MP enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Damar düz kasının kasılma kuvveti genellikle Ca^{2+} konsantrasyonuna bağlı olarak artsa da, Ca^{2+} miktarında bir değişiklik olmadan da artış gösterebilir. Yapılan çalışmalar damarın kasılma kuvvetinin hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonuna oranının ($kuvvet/[Ca^{2+}]_c$), reseptör stimülasyonu ve depolarizasyon aracılı vazokonstriksiyonda farklı olduğunu göstermiştir. Diğer bir ifadeyle; damar düz kas hücrelerinde ölçülen $[Ca^{2+}]_c$ artış göstermeyip sabit kalsa da, kasılma yanıtı güçlenerek devam etmektedir. Agonistle indüklenen stimülasyonda ($kuvvet/[Ca^{2+}]_c$) oranı daha yüksektir. Bu oranın membran depolarizasyonuna göre daha fazla olması; reseptörle uyarılmada, Ca^{2+} konsantrasyonundaki artıştan bağımsız olarak kasılma kuvvetini arttırabilen faktörlerin olduğuna işaret eder. Bu durum, reseptör agonistlerinin, kontraktıl proteinlerin Ca^{2+} 'a duyarlılığını arttırdığını göstermektedir (Akata 2007b).

Vazokonstriktör agonistler G-protein kenetli reseptörlerine bağlandığında, Ca^{2+} konsantrasyonu sabit olduğu halde, kasılma kuvveti artar. Bunun nedeni MLC_{20} 'nin fosforilasyonundaki artışın yanı sıra, myozin ile sıkıca kenetlenen MP enziminin myozinden ayrılarak inhibe olmasıdır. MP inhibe olduğunda MLC_{20} 'nin defosforilasyonu engellenir ve kasılma yanıtı potansiyalize edilir (Somlyo ve Somlyo 1994; Akata 2007b).

Vazokonstriksiyonun başlatılıp sürdürülebilmesi MLC_{20} 'nin fosforile halde kalmasına bağlıdır. Ca^{2+} duyarlılaşması ile vazokonstriksiyona iki şekilde katkı sağlanabilir. Bunlardan biri MLC_{20} 'nin Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak fosforilasyonu, diğeri ise MLC_{20} 'nin defosforilasyonunun inhibisyonudur (Şekil 2-1), (Hirano ve ark. 2004).

Bazı kinazlar MLC_{20} 'yi Ca^{2+} sinyalizasyonundan bağımsız olarak fosforilleyip damarda kasılma yanıtını indükleyebilir. Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan bu kinazlara örnek olarak Rho kinaz, p-21 ile aktive edilmiş protein kinaz (PAK), integrin ilişkili kinaz (ILK) ve zip kinaz verilebilir (Hirano ve ark. 2004).

Rho kinazın ve PAK'ın MLC₂₀'yi Ser19'dan fosforilledikleri bilinmektedir. ILK'nın ve zip kinazın ise fosforilasyon bölgesi olarak hem Ser19 hem de Thr18'i kullandığı gösterilmiştir. Ser19 bölgesi aynı zamanda MHZK'nın da tercih ettiği bir fosforilasyon bölgesidir (Kureishi ve ark. 1997; Van Eyk ve ark. 1998; Niuro ve Ikebe 2001; Ti Deng ve ark. 2001; Hirano ve ark. 2004).

MLC₂₀'nin defosforilasyonunu sağlayan MP enziminin inaktivasyonu (inhibisyonu) da myofilamentlerin Ca²⁺ duyarlılığını arttıran bir mekanizmadır. MP enzimi bir katalitik, iki non-katalitik olmak üzere; toplam üç subüniteden oluşur: i) protein tip 1 fosfataz c (PP1_C) (katalitik subünite, 38 kDa), ii) myozin fosfataz hedef subünite MYPT1 (non-katalitik subünite, 110 kDa), iii) fonksiyonu bilinmeyen subünite M20 (non-katalitik subünite, 20 kDa). MP'nin subünitelerinden MYPT1, MP enziminin myozine hedeflenmesini sağlarken; PP1_C subünitesi MLC₂₀'nin defosforilasyonunu gerçekleştirebilir (Hirano ve ark. 2004).

2.2.2.1. MP enziminin inhibisyonu

MP enziminin inhibisyonu 3 şekilde sağlanır: i) MP enziminin konformasyonel yapısının değişmesi, ii) MP enziminin subünitelerinden olan MYPT1'in fosforilasyonu ve iii) CPI-17 (Protein tip 1 fosfatazın inhibitör proteini, 17 kDa) fosforilasyonu ile MP enziminin subünitelerinden olan PP1_C'nin fosforilasyonu.

MP'nin heterotrimerik yapısının değişmesi sonucu enzimin inaktive olmasıyla Ca²⁺ duyarlılaşmasının sağlandığını gösteren birçok çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmalar, araşidonik asitin MYPT1'i PP1_C'den ayırıp MP'yi inaktive ederek Ca²⁺ duyarlılaşmasını arttırdığını; protein kinaz C'nin (PKC) ise MYPT1'in ankyrin tekrar bölgelerini fosforillemek suretiyle MYPT1 ve PP1_C birleşimini engellediğini ve MLC₂₀'yi fosforile ettiğini göstermektedir (Ming Cui Gong ve ark. 1992; Tóth ve ark. 2000). Ferret (dağ gelinciği) portal venine ait izole düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada, PGF_{2α} uygulaması ile indüklenen kasılma esnasında, dinlenim durumunda sitozolde birlikte bulunan MYPT1 ve PP1_C subünitelerinin lokalizasyonunun değiştiği gösterilmiştir. Kasılma yanıtının başlatılmasıyla MYPT1 sitozolden plazma membranına doğru hareket etmiştir ve kasılma boyunca orada kalmıştır. Ancak, PP1_C ilk etapta membrana göç etmede; sonrasında sitozole geri dönmüştür. MYPT1 ve PP1_C subünitelerinin ayrılması sonucu MP'nin değişen konformasyonu enzimi inhibe etmiş

ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ 'nın Ca^{2+} duyarlılaşması aracılığıyla kasılma yanıtını sürdürmesini sağlamıştır (Shin ve ark. 2002; Hirano ve ark. 2004).

MYPT1 subünitesi MP enziminin aktivasyonunu veya inaktivasyonunu sağlayacak birçok fosforilasyon bölgesi içerir. Çeşitli kinazlar ile fosforillenerek MP enzimini inhibe eden ve Ca^{2+} duyarlılaşmasına yol açan fosforilasyon bölgesi T_{696} 'dır. T_{696} 'yı fosforile eden kinazlar arasında Rho kinaz, myotonik distrofi protein kinaz, zip kinaz, zip-benzeri kinaz, ILK ve PAK sayılabilir (Kimura ve ark. 1996; MacDonald ve ark. 2001; Murányi ve ark. 2001; Niuro ve Ikebe 2001; Kiss ve ark. 2002; Takizawa ve ark. 2002; Hirano ve ark. 2004).

CPI-17 MP enzimini PP1c subünitesini fosforilleyerek inaktive eden bir proteindir. Hem vasküler hem de iç organlara ait düz kaslarda eksprese olmaktadır. T_{38} bölgesinden fosforile olup aktifleşen CPI-17, PP1c'yi inhibe ederek MP'yi inaktive eder ve Ca^{2+} duyarlılaşmasına katkıda bulunur. Daha çok PKC'nin substratı olsa da, rho kinaz, zip-benzeri kinaz, ILK ve protein kinaz N (PKN) gibi kinazlar CPI-17'yi fosforile ederek aktivitesini düzenleyebilir ve Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayabilir (Eto ve ark. 1997; Hamaguchi ve ark. 2000; Koyama ve ark. 2000; MacDonald ve ark. 2001; Deng ve ark. 2002; Takizawa ve ark. 2002; Hirano ve ark. 2004).

2.2.3. Kalsiyum Duyarlılaşmasına Aracılık Eden Hücresel Yolaklar

Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan haberci kaskat mekanizmalara Rho A/Rho kinaz, PKC, araşidonik asit ve tirozin kinaz yolağı örnek olarak verilebilir (Şekil 2-1), (Somlyo ve Somlyo 1994; Akata 2007b).

2.2.3.1. RhoA/Rho Kinaz

Küçük monomerik bir G proteini olan RhoA'nın ve aktive ettiği Rho kinazın, Ca^{2+} duyarlılaşması sağlamak için MP'ye inhibitör sinyal gönderdiği bilinmektedir. RhoA GDP ile bağlı olduğunda inaktif, GTP ile bağlandığında ise aktiftir. Guanin nükleotid exchange (değişim) faktörleri (GEF), GDP'nin GTP ile yer değiştirmesini uyararak RhoA'yı aktive ederler (Somlyo ve Somlyo 2000; Akata 2007b).

RhoGEF'lerin aktivasyonu ise G-protein kenetli reseptörlerin agonistle stimülasyonu sonucu gerçekleşir. $\text{G}_{\alpha q}$ kenetli reseptörlerin stimülasyonu sonucu PLC

enzimi aktive olur. Bu enzim IP_3 ve DAG ikincil habercilerinin oluşumunu artırır. IP_3 hücre içi Ca^{2+} miktarını artırarak MLC_{20} fosforilasyonu ile vazokonstriksiyona katkı sağlar. DAG ise Ca^{2+} duyarlılaşmasına aracılık eden mekanizmalardan PKC'yi aktive ederek MP enziminin inhibisyonu ile MLC_{20} 'nin defosforilasyonunu engelleyip, kasılma yanıtının potansiyalizasyonunu sağlar. $G_{\alpha12/13}$ kenetli reseptörlerin uyarılması ise RhoGEF'leri aktive eder. $G_{\alpha q}$ kenetli reseptörleri uyaran bazı endojen agonistlerin (noradrenalin, serotonin, A-II, ET-1 vb.) aynı zamanda $G_{\alpha12/13}$ kenetli reseptörleri de uyarabildiği belirlenmiştir. G-protein kenetli reseptörlerin sinyalizasyonuna ek olarak, membran depolarizasyonu sonucu artan hücre içi Ca^{2+} da RhoGEF'lerin aktivasyonunu sağlayabilmektedir (Somlyo ve Somlyo 2003; Mills ve ark. 2015).

RhoGEF'lerin aktif hale getirdiği Rho A, sitozolden plazma membranına geçiş yapar. Bu geçiş, RhoA'nın C-terminaline tutunan hidrofobik özellikteki geranilgeranil ile kolaylaştırılır. Plazma membranına gelen Rho A, Rho kinazı aktifleştirir. Rho kinaz genel olarak sitozolde bulunsa da, aktifleştğinde kısmen plazma membranına taşınır. Aktifleşen Rho kinaz MYPT1'i fosforile eder. MYPT1'in fosforilasyonu MP'yi etkisiz hale getirerek MLC_{20} 'nin defosforile olmasına engel olur ve kasılma yanıtı artırılır (Somlyo ve Somlyo 2000; Akata 2007b; Liu ve Khalil 2018). Rho kinazın hedef molekülü sadece MYPT1 ile sınırlı değildir. Bunun dışında CPI-17, MLC_{20} ve kalponini hedefleyebilir (Kaneko ve ark. 2000; Kitazawa ve ark. 2000; Liu ve Khalil 2018). Bunlara ek olarak, aktifleşen Rho kinaz damar düz kasında bulunan insülin reseptör substrat-1'i (IRS-1) fosforile edebilir. Hipertansif sıçanlarda yapılan bir çalışmada, ROCK-IRS-1 etkileşiminin arttığı ve damarlarda insülin sinyalizasyonunun azaldığı bildirilmiştir (Begum ve ark. 2002; Liu ve Khalil 2018).

Bir serin/treonin kinaz olan Rho kinazın ROCK-1 ve ROCK-2 olmak üzere 2 izoformu vardır. Her iki izoformun kalp ve damar düz kaslarında eksprese olduğu bilinmektedir (Wibberley ve ark. 2003; Liu ve Khalil 2018). Ancak MP enzimine direkt olarak bağlanıp vazokonstriksiyona katkıda bulunan izoformun ROCK-2 olduğunu ve yine damar düz kasının kasılmasında ROCK-2'nin rolünün ROCK-1'e göre daha baskın olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Wang ve ark. 2009; Liu ve Khalil 2018).

Rho kinaz enziminin aktivitesini inhibe eden küçük GTP bağlayıcı protein ailesinden RhoE, Gem ve Rad gibi proteinlerin de bulunduğu bilinmektedir. (Ward ve ark. 2002; Riento ve ark. 2003; Liu ve Khalil 2018).

2.2.3.2. Araşidonik asit

Araşidonil fosfolipidlerinin fosfolipaz A₂ (PLA₂) enzimiyle parçalanması sonucu araşidonik asit oluşur. Araşidonik asit veya reseptör uyarısıyla aktive olan fosfolipaz D; Rho A'dan bağımsız, direkt olarak Rho kinazı aktiveleştirebilir. Aktifleşen Rho kinaz MYPT1 veya CPI-17'yi fosforile eder. Her iki yolak da MP'yi inhibe ederek Ca²⁺ duyarlılaşması oluşturabilir. (Akata 2007b; Kuo ve Ehrlich 2015).

2.2.3.3. Protein kinaz C

PKC ailesi serin/treonin kinazlardan olup 4 ana gruba ayrılır: klasik A grubu, yeni B grubu, atipik C grubu ve D grubu. PKC neredeyse tüm hücre tiplerinde bulunur, bu hücre tiplerine damar endotel ve düz kas tabakaları dahildir. Damar düz kasında bulunan izoformlar klasiklerden cPKC α , cPKC β , cPKC γ ; yenilerden nPKC δ , nPKC ϵ ve atipiklerden aPKC ζ 'dir. Klasiklerin aktivasyonunu Ca²⁺, DAG, fosfatidilserin (PS) sağlarken, yeni türevleri DAG, PS, forbol esterleri; atipikleri ise yalnız PS aktiveleştirebilir (Liu ve Khalil 2018).

PKC'lerin Ca²⁺ duyarlılaşmasına katkısı ise; Ca²⁺ duyarlılaştırıcı agonistlerin G-protein kenetli reseptörlerine bağlanması ile meydana gelen kaskad mekanizmalar ve ikincil habercilerin PKC'leri aktive etmesi sonucu oluşur. G-protein kenetli reseptörlerin aktive ettiği PLC enzimi PIP₂'den IP₃ ve DAG ikincil habercilerini oluşturur. IP₃ hücre içi Ca²⁺ düzeylerini artırırken, DAG PKC'yi aktive eder. Aktifleşen PKC; MYPT1'i fosforile edip MP'yi inhibe eder ve myofilamentlerin Ca²⁺ duyarlılığını artırır. PKC'yi G-protein kenetli reseptörlerine bağlanarak aktive eden endojen maddeler arasında A-II, noradrenalin, insülin, epidermal büyüme faktörü, dopamin ve endorfin sayılabilir. Bunun dışında PKC birkaç farklı mekanizmada daha rol oynayarak Ca²⁺ duyarlılaşmasına katkıda bulunur. Bunlardan biri CPI-17 fosforilasyonudur, diğeri ise aktin bağlayıcı proteinlerden kalponin ve kaldesmonun fosforillenmesidir. Kalponin ve kaldesmon proteinleri, aktin ile aktive edilen myozin-ATPaz enzimi üzerinde inhibitör etki gösterirler. Bu proteinlerin fosforilasyonu, aktin ile aktive edilen myozin-ATPaz enzimi üzerindeki inhibitör etkiyi kaldırır. Böylece, damardaki kasılma yanıtı artırılır (Kitazawa ve ark. 2000; Akata 2007b; Brozovich ve ark. 2016). Bunlara ek olarak, yapılan çalışmalar A-II'nin PKC'lerin damardaki birçok izoformunu aktif hale

getirebildiğini ve vazodilatör etkili atriyal natriüretik peptide (ANP) ait reseptör sayısını azalttığını göstermiştir. ANP reseptörlerinin sayısındaki azalma, ANP'nin etkisini inhibe ederek vazokonstriksiyona katkıda bulunur (Jiao ve Yang 2015; Liu ve Khalil 2018).

PKC Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan mekanizmalar dışında, K^+ ve Ca^{2+} kanallarının modülasyonu aracılığıyla da vazokonstriksiyona katkıda bulunabilir (Liu ve Khalil 2018). Bunun dışında, forbol esterleri veya DAG analogları ile fosforillenen PKC'nin Na^+/H^+ pompasını aktive edip pH'ın artmasına yol açtığı bildirilmiştir. pH'ın artması ile gelişen alkalinizasyonun genel olarak vazokonstriksiyona katkıda bulunduğu gözlenmiştir (Wray ve Smith 2004; Liu ve Khalil 2018).

PKC'nin vazodilatör etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Tavşan mezenterik arter düz kaslarında ekzojen PKC'nin MLC_{20} 'yi ve MHZK'yı fosforile ederek aktin-myozin kenetlenmesini ve vazokonstriksiyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Inagaki ve ark. 1987; Liu ve Khalil 2018). İnsan damarlarında yapılan bir çalışmada, PKC'nin vazodilatör etkili C-tipi natriüretik peptidi (CNP) uyardığı bildirilmiştir (Ahluwalia ve ark. 2004; Mendonça ve ark. 2006; Liu ve Khalil 2018). Başka bir çalışmada ise PKC'nin eNOS aktivitesini arttırıp NO'ya bağlı vazodilatasyonu indüklediği gösterilmiştir (Wang ve ark. 2015; Liu ve Khalil 2018).

2.2.3.4. Tirozin kinaz ve Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz

Damar düz kasında bulunan tirozin kinaz, vasküler tonüsün regülasyonuna hem Ca^{2+} konsantrasyonunu değiştiren, hem de Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan mekanizmaları etkileyerek katkıda bulunur. Ca^{2+} kanallarının, K^+ kanallarının, PLC, PLD (Fosfolipaz D) ve MAPK'nin (mitojenle aktive edilen protein kinaz) aktivitesini düzenler. PLD, DAG oluşumuna aracılık ederek, Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan PKC oluşumunu destekler. Ayrıca MAPK aktivasyonu ile kaldesmon proteini fosforile edildiğinde, kaldesmonun aktomyozin ATPaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisi baskılanır. Aktomyozin ATPaz enzimi aktin ve myozin kenetlenmesi için gerekli enerji oluşumunu sağlayan enzim olup kasılmadan önceki son basamaktır. Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak aktomyozin ATPaz enziminin aktive edilmesi, myofilamentlerin Ca^{2+} duyarlılığı arttırarak kasılma yanıtına katkıda bulunur (Akata 2007b). Bunlara ek olarak tirozin

2.3. Vazodilatasyon Oluşturan Mekanizmalar

2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Düzeyinin Azaltılması

Hücre içi Ca^{2+} düzeylerini azaltan başlıca yollar PMCA, SERCA ve iyon değiştirici pompa NCX'dir (Akata 2007a).

PMCA, enerji bağımlı olarak hücreden Ca^{2+} çıkışını ve yerine 2 adet Hidrojen (H^+) iyonu girişini sağlar. Hücrede H^+ artışı aynı zamanda pH'ın düzenlenmesine aracılık eder. Bunların yanı sıra, PMCA başka bir pompa ile koordine çalışır. Bu pompa 3 Na^+ iyonunu dışarı atıp, 2 K^+ iyonunu içeride biriktiren Na^+/K^+ -ATPaz pompasıdır. Böylelikle PMCA, hücrede Na^+ ve K^+ iyonlarının gradientinin oluşumuna katkıda bulunur. PMCA pompasında CaM bağlayıcı bölgeler bulunmaktadır. CaM bu bölgelere bağlandığında PMCA'nın Ca^{2+} 'a afinitesini artırır. CaM bağlayıcı bölgeler PKA, PKC ve PKG gibi çeşitli protein kinazlar tarafından fosforillenerek aktive edilebilir. PMCA'nın aktivasyonu hücre dışına Ca^{2+} çıkışını arttırarak sitozoldeki Ca^{2+} miktarını azaltır. $[\text{Ca}^{2+}]$ 'daki azalma MHZK'nın inaktive olmasına, MP'nin ise aktivasyonuna yol açar. MP aktivasyonu, MLC_{20} 'nin defosforilasyonunu ve aktomyozin ATPaz'ın inhibisyonunu sağlayarak gevşeme yanıtını tetikler (Akata 2007a).

SERCA pompası, damar düz kas hücresinden sarkoplazmik retikuluma aldığı her 1 Ca^{2+} iyonu için sitozole 1 K^+ ve 1 H^+ iyonu gönderir. SR lümenine gönderilen iyonlar, kalretikülin ve kalsekstrin gibi hidrofil proteinlere bağlanabilirler. Bu proteinler yüksek miktarda Ca^{2+} iyonu bağlama kapasitesine sahip olup tampon etkisi yaparlar ve SR'nin Ca^{2+} depolama yeteneğini arttırırlar. SERCA'nın aktivitesini düzenleyen fosfolamban proteini defosforile durumda iken SERCA inaktif olur. Fosfolamban fosforillendiğinde ise SERCA'nın Ca^{2+} 'a afinitesi artar ve sitozolden SR'a Ca^{2+} geçişi olduğu için sitozolik Ca^{2+} düzeyleri azalır. PKA, PKC ve PKG gibi kinazlar fosfolambanı fosforilleyip SERCA'nın aktivitesini arttırarak vazodilatasyona aracılık edebilirler (Akata, 2007a; Ottolini ve ark. 2019).

NCX pompası 1 Ca^{2+} iyonunu dışarı atarken 3 Na^+ iyonunu içeri alarak iyon dengesini sağlar. Damar düz kas hücrelerindeki ekspresyonu kardiyak myositlere veya nöronlara kıyasla daha düşük olsa da sitozolik $[\text{Ca}^{2+}]$ 'un azalmasına katkı sağlar (Akata 2007a).

2.3.2. Siklik Nükleotidler

Damar düz kasında cGMP (siklik guanozin 3',5'-monofosfat) ve cAMP (siklik adenozin 3',5'-monofosfat) artışı vazodilatasyona aracılık eden temel mekanizmalardandır (Akata, 2007b).

NO, CO (karbon monoksit) ve natriüretik peptidler gibi endojen vazodilatörler, cGMP düzeylerini arttırarak vazodilatasyon oluşturur. Genellikle endotel tabakasında sentezlenen vazodilatör maddelerin damardaki konsantrasyonu arttığında; NO ve CO, sGC'yi (soluble-çözünür guanilat siklaz); natriüretik peptidler ise membrana bağlı GC'yi aktive eder. GC aktivasyonu cGMP düzeylerini arttırır. Artan cGMP, PKG'yi aktive eder. PKG aktivasyonu, hücre içi Ca^{2+} düzeylerini ve Ca^{2+} duyarlılaşmasını azaltarak vazodilatasyon sağlar. PKG'lerin hücre içi Ca^{2+} 'u azaltmasında rol oynayan mekanizmalar çok çeşitlidir. Bunlara; SR'nin SERCA aracılığı ile Ca^{2+} 'u hücre içi depolara alması, PMCA veya NCX aracılığıyla Ca^{2+} 'un dışarı atılması, SR'nin IP_3 reseptörlerinin PKG ile fosforilasyonu sonucu IP_3 'ün inhibisyonu, hiperpolarizasyona neden olarak sitozolik Ca^{2+} 'u azaltan K^+ kanallarının aktivasyonu, Ca^{2+} kanallarının inhibisyonu örnek gösterilebilir. PKG'nin Ca^{2+} duyarsızlaştırıcı etkisi ise MP'yi upregüle ederek; MLC_{20} 'nin defosforilasyonunu ve kontraktıl filamentlerin Ca^{2+} duyarsızlaşmasını sağlayarak vazodilatasyon oluşturmaktadır (Akata 2007b; Kuo ve Ehrlich 2015).

GC aktivasyonu dışında cGMP düzeylerini arttıran bir mekanizma da PDE (fosfodiesteraz) enziminin inhibisyonudur. cGMP, PDE ile parçalandığından, bu enzimin inhibisyonu cGMP düzeylerini ve vazodilatasyonu arttırır (Akata 2007b).

Reseptör stimülasyonu sonucu damar düz kasında cAMP düzeylerinin artışı da vazodilatasyonu başlatan önemli mekanizmalardan biridir. cAMP artışı PKA'yı aktive eder. Aktifleşen PKA sitozolik $[Ca^{2+}]$ 'u veya Ca^{2+} duyarlılaşmasını azaltan mekanizmalarda rol alarak damarların gevşemesini sağlar. PKA'nın hücre içi Ca^{2+} miktarını azaltmasını sağlayan mekanizmalar arasında; PLC ve Ca^{2+} kanallarının inhibisyonu, PMCA'nın aktivasyonu, fosfolamban fosforilasyonu ile Ca^{2+} 'un SR'ye alınması ve K^+ kanallarının aktivasyonu sayılabilir. PKA'nın, kontraktıl myofilamentleri Ca^{2+} 'a duyarsız hale getirerek vazodilatasyona aracılık ettiği mekanizmalar ise: MHZK

fosforilasyonu ve MHZK'nın Ca^{2+} -CaM kompleksine afinitesinin azaltılmasıdır (Rembold 1992; Akata, 2007b).

Bunlara ek olarak çapraz bir aktivasyon ile cGMP, PKA'yı, cAMP ise PKG'yi aktive ederek vazodilatasyon oluşturabilir (Akata 2007b).

2.3.3. Potasyum Kanalları

Vasküler tonüsün düzenlenmesinde K^+ kanallarının önemi büyüktür. En az 5 alt tipi olan K^+ kanallarının dağılımını ve düzenlenmesini etkileyen birçok faktör bulunmakla birlikte, damar yatağı farkı belirleyen önemli etkenlerdendir. K^+ kanallarının blokajı, depolarizasyona neden olarak voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının aktivasyonuna yol açar ve hücre içi Ca^{2+} miktarını arttırarak vazokonstriksiyonu başlatır. K^+ kanallarının aktivasyonu sonucunda ise hücreden K^+ çıkışı olur ve buna bağlı olarak hiperpolarizasyon gerçekleşir. Düz kas hücresinde meydana gelen hiperpolarizasyon voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarını inhibe eder. Hücre içi Ca^{2+} miktarının azalması sonucu vazodilatasyon oluşur (Akata 2007b). Ayrıca, K^+ kanallarının açılmasıyla gerçekleşen hiperpolarizasyonun myofilamentlerin Ca^{2+} duyarsızlaşmasına neden olarak vazodilatasyona katkı sağladığı bildirilmiştir (Tykocki ve ark. 2017).

Voltaj bağımlı K^+ kanalları (K_v), depolarizasyon ile aktifleşir. Aktivasyonu, hücre içi Ca^{2+} miktarının azalmasına neden olarak vazodilatasyon sağlar. NO, EDHF veya PGI_2 vb. vazodilatör maddelerin K_v kanallarını aktive ettiği gösterilmiştir. (Tykocki ve ark. 2017).

Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalları (K_{Ca}), depolarizasyon ve Ca^{2+} artışı ile aktifleşirler. K_{Ca} 'lar aktifleştğinde, hücreden K^+ çıkararak hücrede hiperpolarizasyona neden olurlar ve bu şekilde vazodilatasyona katkıda bulunurlar. İletkenliklerine göre küçük (SK), orta (IK) ve büyük (BK) kondüktanslı olarak üçe ayrılan K_{Ca} 'lardan, SK ve BK'ların damarlarda eksprese olduğu bilinmektedir. K_v 'lerde olduğu gibi NO, EDHF veya PGI_2 ile aktive edilebilen BK'ların fosforilasyonunda PKA ve PKG'nin rolü olduğu gösterilmiştir. SK kanallarının ise bazı damarlarda, EDHF'nin gevşetici etkisine aracılık eden hiperpolarizasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Akata 2007b; Tykocki ve ark. 2017)

ATP duyarlı K^+ kanallarının (K_{ATP}) serebral, koroner ve mezenterik arter gibi damar yataklarında bulunduğu bilinmektedir. Voltaj bağımlılığı zayıf olan K_{ATP} kanallarının aktivasyonu ATP miktarına ve pH'ya bağlıdır. Mitokondride ATP miktarı azaldığında veya asidoz durumunda aktif hale gelen K_{ATP} , damar düz kas hücrelerinin hiperpolarizasyonunu ve buna bağlı olarak damarın gevşemesini sağlar. K_{ATP} 'yi aktive edebilen endojen vazodilatörler arasında adenosin, PGI_2 , NO, CGRP (kalsitonin gen ilişkili peptid), VIP (vazoaktif intestinal peptid) ve β -adrenerjik agonistler sayılabilir. (Akata 2007b; Tykocki ve ark. 2017).

İçe akım K^+ kanallarının (K_{ir}), tercihen rezistans damarlarda eksprese olduğu ve dinlenme (istirahat) membran potansiyelinin oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. K_{ir} 'in serebral ve koroner arter gibi bazı damar yataklarında, ekstraselüler K^+ artışıyla aktive olup güçlü bir hiperpolarizasyon ve buna bağlı vazodilatör yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (Akata 2007b; Tykocki ve ark. 2017).

2.3.4. Ca^{2+} /Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II (CaMKII)

CaMKII Ca^{2+} konsantrasyonu yüksek olduğunda aktif olan bir enzimdir. MHZK'yı fosforile ederek, MHZK'nın CaM'e afinitesini ve MLC₂₀'nin Ca^{2+} duyarlılığını azaltarak vazodilatasyona katkıda bulunur (Somlyo ve Somlyo 1994; Akata 2007a).

2.4. Hidrojen Sülfür (H_2S)

2.4.1. Genel Özellikleri ve H_2S Donörleri

H_2S suda çözünebilen ve çözündüğünde H^+ , HS^- ve S^{2-} iyonlarını oluşturan; zayıf asit karakterde, renksiz ve alev alabilen, çürük yumurta kokusunda uçucu bir gazdır. H_2S 'in hidrofilik özelliği yanında lipofilik olması biyolojik membranlardan kolayca geçmesini sağlar (Mathai et al. 2009; Liu ve ark. 2012). Yıllarca toksik bir gaz olarak bilinen H_2S , günümüzde NO ve CO'dan sonra üçüncü gazotransmitter olarak kabul edilmektedir (Dongo ve ark. 2018).

H_2S 'in kan ve dokularda ölçülen serbest düzeyleri 14-15 nM civarındadır (Furne ve ark. 2008). Taze kan ve dokularda 35 μM 'ın üzerinde ölçülen konsantrasyonlarda kötü bir koku yayılmazken; H_2S donörleri ile 10 μM sülfid hazırlandığında çok kuvvetli

ve karakteristik H_2S kokusu algılanır (Zhu ve ark. 2006; Liu ve ark. 2012). Bunun nedeninin H_2S 'in organizmada endojen olarak üretilmesinden sonra hızlıca sülfat formuna okside olması veya fizyolojik bir uyaran gelene kadar proteinlerde depolanması ihtimalleriyle açıklanmıştır (Ishigami ve ark. 2009; Liu ve ark. 2012).

Memelilerde endojen olarak sentezlenebilen H_2S , L-sistein ve D-sistein aminoasitlerinden 4 enzim aracılığıyla sentezlenir. Bu enzimler: sistatyonin γ -liyaz (CSE), sistatyonin β -sentaz (CBS), sistein aminotransferaz (CAT) ile birlikte 3-merkaptopiruvat sülfürtransferazdır (3-MST) (Liu ve ark. 2012; Bełtowski 2015; Dongó ve ark. 2018;).

H_2S 'in katabolizmasından sorumlu temel yolak oksidasyondur. H_2S temel olarak sülfata okside olarak yıkılır ve böbrekler aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılır. Vücutta hemen hemen tüm hücreler oksidasyon yoluyla kimyasalları biyotransformasyona uğratabilse de, oksidasyon temelde karaciğerde gerçekleşir. H_2S 'in oksidasyonu mitokondride tiyosülfata dönüşümle başlayıp, ardından sülfat oksidaz enzimi aracılığıyla sülfat ve sülfata dönüştürülerek devam eder. H_2S 'in yıkımını sağlayan diğer bir yol da metilasyondur. H_2S 'in metilasyonunda, sitozolik S-metil transferaz enzimiyle metantiyol ve dimetilsülfid oluşturulur. Kanda düşük konsantrasyonda bulunan H_2S 'in, çok az bir kısmı da akciğerlerden uzaklaştırılır (Furne ve ark. 2001, 2008; Liu ve ark. 2012).

Gaz halinde olan H_2S 'in deneysel çalışmalarda kullanımlarını kolaylaştırmak için katı formda olan donörleri geliştirilmiştir. Sıklıkla kullanılan donörler sülfid tuzları ve sentetik donörlerdir (Powell ve ark. 2018).

Biyolojik çalışmalarda kullanılan sülfid tuzlarının en çok tercih edilenleri sodyum hidrosülfid ($NaHS$) ve sodyum sülfiddir (Na_2S). Donör olarak da adlandırılan bu tuzlar katı formdadırlar. Ekzojen H_2S 'in etkisini değerlendirmek için kullanılırlar. Suda çözüldüklerinde HS^- , S^{2-} iyonlarına ve H_2S 'e ayrılırlar. Oluşan üç form arasında denge sağlandıktan sonra buharlaşma başlar. Bu nedenle suprafizyolojik dozlarda (10 μM – 1mM) kullanılması gereklidir (Kuo ve ark. 2016; Powell ve ark. 2018). H_2S 'in plazmada ölçülen fizyolojik değer aralığı ise 40 - 300 μM arasındadır (Kimura 2002). Ancak H_2S uçucu bir gaz olduğundan deney esnasında hedef dokuya ulaşacak miktarın göz önünde bulundurularak doz ayarının yapılması daha uygundur (Streeter ve ark. 2012). $NaHS$ 'in kullanıldığı bir çalışmada çözeltideki H_2S konsantrasyonunun tatbik

edilenin %10'undan daha az olduğu bildirilmiştir (Al-Magableh ve Hart 2011). NaHS ve Na₂S biyolojik araştırmalarda yaygın kullanılan donörlerdir. Kısa sürede fazla miktarda gaz serbestleştirebilen bu donörler ekzojen H₂S'in etkisini araştıran çalışmalarda kullanılır. Ancak kardiyovasküler hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalarda fizyolojik konsantrasyonlara daha yakın olması nedeniyle sentetik donörler tercih edilir (Zhang ve ark. 2018).

Sentetik donörler hızlı (Ör: diallil trisülfid-DATS) ve yavaş (Ör: GYY4137) salımlı olarak gruplandırılabilir. Hızlı veya yavaş donörlerin tercihi çalışmanın alanına göre değişmektedir. DATS'ın kardiyak apoptoz çalışmasında antioksidan olarak; GYY4137'nin ise daha çok vasküler reaktivite çalışmalarında kullanıldığı bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2018).

Suda çözünen yavaş salımlı donörler belli bir mekanizmaya göre serbestlenme yaparlar. Bu mekanizmalar spesifik bir nükleofil, dalga boyu veya enzim olabilir. Sülfid tuzlarının aksine terapötik potansiyeli olan sentetik donörler faz çalışmalarında da kullanılmaktadır. Sentetik donörler arasında en çok tercih edilen GYY4137'dir. Suda çözünen GYY4137 hidroliz ile H₂S salımı yapar. Ancak bu serbestleşme sülfid tuzlarına kıyasla çok daha uzun sürer (Powell ve ark. 2018). GYY4137 ve NaHS'in fizyolojik pH'da fosfat tamponundaki serbestlenme hızları sırasıyla 10 dk ve 10 sn'dir. Konsantrasyonları kıyaslandığında ise NaHS'in konsantrasyonu GYY4137'ye göre 40 kat daha fazladır. Sıçan aortasında yapılan bir çalışmada GYY4137 ve NaHS'in gevşeme yanıtları karşılaştırılmıştır. Buna göre GYY4137 (200µM) NaHS'e kıyasla (300 µM) daha geç başlayan ancak daha uzun süren bir gevşeme yanıtına neden olmuştur (Li ve ark. 2008).

2.4.2. H₂S'in Sentezi

H₂S enzimatik ve non-enzimatik olarak sentezlenebilir. Non-enzimatik sentez, element olan sülfürün veya organik polisülfidlerin, glutasyon bağımlı veya glukoz destekli ve tiyol bağımlı hücrel redüksiyon reaksiyonları ile gerçekleşir. H₂S'in non-enzimatik üretimi daha çok eritrositlerde meydana gelir. Ancak, damarlarda da non-enzimatik olarak sentezlenebildiği bildirilmiştir (Benavides ve ark. 2007; Gheibi ve ark. 2018).

H₂S'in enzimatik sentezinden sorumlu 4 enzim bulunur: CSE, CBS, CAT ve 3-MST. CBS ve CSE enzimleri sitozolde bulunurken, 3-MST ile CAT enzimleri hem mitokondri hem de sitozolde lokalize olur (Allsop ve Watts 2015; Gheibi ve ark. 2018).

CBS, kofaktör olarak "hem" molekülünü kullanan, piridoksal-5-fosfat (PLP) bağımlı bir enzimdir. L-sistein prekürsöründen β -replasman reaksiyonu ile H₂S oluşumunu katalizler. Sistatyonin ve H₂S oluşumu için, L-sistein ile homosistein kondanse olur (Chen ve ark. 2004; Cheng ve ark. 2004; Dunn ve ark. 2016). CBS enziminin aktivatörü S-Adenozil metiyonin iken, inhibitörü Amino-oksiasetik asittir (AOAA) (Dunn ve ark. 2016). S-Adenozil metiyonin dışında testosteron ve Ca²⁺/Kalmodulin de CBS'nin aktivitesini düzenleyebilir (Powell ve ark. 2018).

CSE, piridoksal-5-fosfat bağımlı ve aktivitesi Ca²⁺ bağımlı olarak düzenlenen bir enzimdir. Ca²⁺ konsantrasyonu düşük olduğunda aktifleşen CSE enziminin, Ca²⁺ miktarı yükseldiğinde inhibe olduğu gösterilmiştir (Mikami ve ark. 2013; Dunn ve ark. 2016). L-sistein aminoasidinin CSE tarafından hidroliz edilmesiyle açığa çıkan H₂S'in yanında piruvat ve amonyum iyonları da oluşur. CSE enziminin irreversibl inhibitörü DL-Proparjilglisindir (DL-PAG) (Sun ve ark. 2009; Dunn ve ark. 2016).

3-MST diğer enzimlerden farklı olarak L-sistein haricinde α -ketoglutaratı da H₂S sentezinde substrat olarak kullanabilen, 3-merkaptopiruvattan H₂S sentezlenmesine aracılık eden enzimdir (Shibuya ve ark. 2009a, 2009b). CAT enzimi ise, L-sistein ve α -ketoglutarattan 3-merkaptopiruvat oluşmasını sağlayarak H₂S'in 3-MST aracılı üretimine katkıda bulunur (Dunn ve ark. 2016). Ayrıca, 3-MST enzimi H₂S'in sentezinde D-sisteini de prekürsör olarak kullanabilir (Shibuya ve Kimura 2013). D-sistein yolağının beyincik ve böbrekte aktif olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Shibuya ve ark. 2013; Shibuya ve Kimura 2013). CAT/3-MST enzimlerinin aktivitesinin Ca²⁺ yokluğunda maksimal düzeyde olduğu ve 2,9 μ M Ca²⁺'un aktiviteyi baskıladığı bildirilmiştir (Mikami ve ark. 2011; Shibuya ve Kimura 2013).

H₂S'in endojen olarak sentezlenmesinde CAT/3-MST'nin rolü, bu enzimlerin hem mitokondri hem de sitozolde bulunması nedeniyle daha fazladır. Buna ek olarak, H₂S prekürsörü sisteinin konsantrasyonu, sitozole kıyasla mitokondride daha yüksektir. Bu nedenle, CAT/3-MST enzimleriyle sentezlenen endojen H₂S'in büyük bir kısmı mitokondride bulunmaktadır. (Moore ve Whiteman 2015; Gheibi ve ark. 2018). H₂S'in 3-MST aracılığıyla mitokondride sentezlenmesinin, hücreleri oksidatif hasardan

koruduğu ve mitokondrinin fonksiyonlarının devam etmesini sağladığı düşünölmektedir. H_2S 'in düşük dozlarda (10-100 μM) mitokondrideki elektron transport zincirini uyardığı, yüksek dozlarda (0,3-1 mM) ise inhibe ettiği bildirilmiştir (Módis ve ark. 2013; Dunn ve ark. 2016). Nöronal hücrelerde yapılan bir çalışmada, H_2S 'in glutatyon düzeylerini arttırarak oksidatif stresi azalttığı gözlenmiştir (Kimura ve ark. 2010). Bu sonucu destekleyici olarak, H_2S 'in mitokondriye-hedeflendirilmiş donörü olan AP-39'un kullanıldığı bir çalışmada, AP-39'un fare beyin endotel hücrelerinde glukoz oksidaz ile meydana gelen oksidatif mitokondriyal DNA hasarını azalttığı rapor edilmiştir (Szczesny ve ark. 2014; Dunn ve ark. 2016).

2.4.3. H_2S 'i Sentezleyen Enzimlerin Dağılımı

CBS ve CSE organizmada karaciğer, böbrek, beyin, kalp, damar gibi birçok organda birlikte lokalize olmaktadır. Ancak, bazı organ veya sistemlerde bir enzim daha baskındır. Santral sinir sisteminde baskın olan enzim CBS'dir ve beyinde eksprese olmaktadır (Abe ve Kimura 1996). 3-MST enziminin de beyindeki varlığı bilinmekte olup, eksprese olduğu dokulara örnek olarak korteks, beyincik, beyin sapının bir bölümü olan pons ve olfaktor bulbus verilebilir (Shibuya ve ark. 2009b; Shibuya ve Kimura 2013).

Kardiyovasküler sistemde daha çok bulunan enzim ise CSE olup; damarlarda hem düz kas, hem de endotel tabakasında bulunmaktadır (Zhao ve ark. 2001a; Yang ve ark. 2008; Liu ve ark. 2012). Damar düz kas hücrelerinde H_2S 'in artması negatif geri bildirim ile sentezinin azalmasına yol açabilir. Karaciğerde artan H_2S 'e karşı CSE'nin inaktivasyonu H_2S sentezinde azalmaya neden olmuştur (Doeller ve ark. 2005; Gheibi ve ark. 2018; Simpson ve Freedland 2018). Endotel tabakasında da eksprese olan CSE'nin fare, sığır ve insan endotel hücrelerindeki varlığı gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise endoteldeki H_2S sentezine CAT ile birlikte 3-MST enziminin de katkı sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca NaHS'in vazokonstriksiyon oluşturduğu sıçan koroner arterinde yapılan bir çalışmada; H_2S sentezinde CSE'nin rolü olmadığı, sentezi sağlayan enzimin 3-MST olduğu protein ekspresyon düzeylerinin ölçümü ile ortaya konmuştur. Bu çalışmalara göre en azından sıçanlarda endotel hücrelerinde H_2S sentezinin CSE'ye kıyasla baskın olarak CAT/3-MST yolağı ile gerçekleştiği

söylenebilir (Shibuya ve ark. 2009a; Kimura 2011; Kuo ve ark. 2016; Gheibi ve ark. 2018).

H₂S'i sentezleyen tüm enzimler damarlarda bulunsa da, kardiyovasküler sistemde H₂S'in biosentezinden sorumlu olan enzimler CSE ve CAT/3-MST'dir. CSE ve 3-MST'nin hem düz kas hem de endotel tabakasında bulundukları bilinmektedir. Ancak, CAT'ın damarlardaki lokalizasyonu ile ilgili sıçan torasik aortasında yapılan immünohistokimya çalışmasında, CAT enziminin sadece endotel tabakasında bulunduğu gözlenmiştir (Shibuya ve ark. 2009a; Gheibi ve ark. 2018).

2.5. H₂S'in Biyolojik Önemi ve Terapötik Potansiyeli

H₂S organizmada birçok biyolojik olaya aracılık etmektedir. H₂S'in önemli etkilerinden bazıları vazodilatasyon, proliferasyon, inflamasyonun baskılanması ve oksidasyonun inhibisyonudur. Vazodilatör etkisinde rol alan mekanizma genellikle K_{ATP} kanal aktivasyonu iken, antiinflamatuvar etkisinin K_{ATP} kanal aktivasyonu, nükleer faktör kappa b (NF- κ B) inhibisyonu veya hemoksijenaz-1 (HO-1) upregülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Zhao ve ark. 2001b; Baskar ve Bian 2011; Kanagy ve ark. 2017; Qian ve Matson 2017). Proliferatif etkisinde aracılık eden mekanizmanın ise K_{ATP} kanal aktivasyonu, fosfatidil inozitol 3-kinaz (PI₃K) yolağının aktivasyonu, sGC/cGMP aktivasyonu ve hücre içi Ca²⁺ artışı ile ilgili olduğu belirlenmiştir. Bu etkilerinin dışında bazı çalışmalarda, H₂S'in kalpte K_{ATP} kanal aktivasyonu ile (-) inotropik, cAMP'nin inhibisyonu ile de (-) kronotropik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Ji ve ark. 2008; Wang 2012). Ayrıca, prelinik çalışmalarda H₂S'in kalpte oksidasyon ve inflamasyonu azalttığı ve kardiyoprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (Elrod ve ark. 2007; Qian ve Matson 2017).

H₂S'in terapötik etkisinin değerlendirildiği özelliklerinin başında antioksidan ve anjiyojenik özellikleri gelmektedir (Qian ve Matson 2017). Bu özellikleri destekleyen bazı çalışmalar dikkati çekmektedir.

Fare pankreatik β (beta) hücreleri (insülin salgılayan hücreler) ile yapılan kültür çalışmasında; hücreler yüksek düzeyde glukoz maruz bırakılarak oksidatif hasar oluşturulmuştur. Meydana gelen oksidatif stres β hücrelerinin apoptozuna yol açmıştır. Hücrelerin NaHS ile inkübasyonu, oksidatif strese bağlı gelişen apoptozu azaltmıştır. Buna göre, H₂S'in oksidatif stresi azaltarak antiapoptotik etki gösterdiği ortaya

konmuştur. Bu etkinin mekanizmasının antioksidan glutatyon miktarının ve Akt fosforilasyonunun artması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, H₂S'in pankreatik β (beta) hücrelerindeki antioksidan etkisinin diyabette faydalı olduğunu düşündürmektedir (Taniguchi ve ark. 2011; Qian ve Matson 2017).

Yara iyileşmesinde fayda sağlamak amacıyla, H₂S'in anjiyojenik özelliğinin incelendiği bir çalışma mevcuttur. Çalışmanın in vitro bölümünde insan umbilikal ven endotel hücreleriyle (HUVEC) hücre kültürü yapılmıştır. Endotel hücreleri, anjiyojenik etkili vasküler endotelyal büyüme faktörüne (VEGF) maruz bırakıldığında, VEGF'in H₂S'in serbestleşmesini azalttığı; H₂S'in inhibisyonunun da VEGF sinyalizasyonunu azalttığı gözlenmiştir. İn vivo bölümde ise CSE knock-out (CSE genini taşımayan) farelerde aortanın VEGF ile stimülasyonunun anjiyojeneze neden olmadığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda VEGF ile stimülasyon ise, mikrodamarların oluşumuna neden olmuştur. Bu veriler, H₂S'in VEGF aracılı anjiyojeneze katkı sağladığını göstermektedir. Bu etkiye aracılık eden mekanizmanın ise K_{ATP} ve MAPK aktivasyonu olduğu düşünülmektedir (Papapetropoulos ve ark. 2009; Qian ve Matson 2017).

2.6. H₂S'in Vasküler Etkileri

H₂S damar tonüsünün düzenlenmesinde önemli role sahip bir gazotransmitterdir. Bazı damar yataklarında düşük dozlarda vazokonstriksiyona neden olsa da, genellikle çeşitli damar yataklarında farklı mekanizmalarla vazodilatasyon sağlamaktadır.

2.6.1. H₂S'in Vazodilatör Etkisi

H₂S kardiyovasküler sistemde gerek kan basıncının gerekse de damar tonüsünün düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Yapılan çalışmalarda, sık görülen bir kalp-damar hastalığı olan hipertansiyonun gelişimi ile H₂S arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Spontan hipertansif sıçanlarda CSE enzim aktivitesinin ve endojen sülfid düzeylerinin kontrole kıyasla daha az görüldüğü bildirilmiştir (Yan ve ark. 2004; Dongó ve ark. 2018). Bunun yanı sıra, hipertansif hastalarda, kandaki H₂S düzeylerinin hipertansif olmayan hastalara (kontrol) göre daha düşük olması hayvan çalışmalarını destekler niteliktedir (Sun ve ark. 2007). Ayrıca, geleneksel tıp uygulamalarında diallil sülfid

içeren sarımsak, hipotansif (kan basıncını düşürücü) etkisi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Dongo ve ark. 2018).

H₂S'in hipotansif etkili olmasının nedeni, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla damarları gevşeterek vasküler tonüsün düzenlenmesine katkı sağlamasıdır. H₂S aracılı vazodilatasyon ilk defa portal ven ve torasik aortada gözlenmiştir (Hosoki ve ark. 1997). Sıçan aortasında yapılan bir çalışmada, H₂S'in doza bağımlı olarak vazodilatasyon sağladığı ve ilgili mekanizmanın K_{ATP} kanal aktivasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2001). Bununla birlikte, H₂S'in vazodilatör etkisinin, mezenterik arter gibi rezistans arterlerde kapasitans arterlere göre daha belirgin olduğu ve potensinin de daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Cheng ve ark. 2004; Gheibi ve ark. 2018).

H₂S'in siliyer arter ve retinal arter tonüsü üzerinde de etkisi bulunmaktadır. H₂S donörü GYY4137'nin sığır siliyer arterini kısmen K_{ATP} kanal aktivasyonu ile (Chitnis ve ark. 2013), H₂S donörü AP67 ve AP72'nin sığır siliyer arterini endojen H₂S, NO ve K_{ATP} kanal aktivasyonu aracılığıyla (Kulkarni-Chitnis ve ark. 2015) gevşettiği bildirilmiştir. Ayrıca GYY4137 ve NaHS'in domuz retinal arterinde vazodilatör etkili olduğu ve domuz retinal arterinde gevşemeye yol açan perivasküler retina ile hipoksinin gevşetici etkisinin mekanizmasında H₂S'in rol oynadığı rapor edilmiştir (Winther ve ark. 2015). Sığır retinal arterinde NaHS'in gevşetici etkisinin araştırıldığı çalışmada ise gevşetici etkisinin endotelden, NO, COX, guanilat ve adenilat siklazdan bağımsız olduğu ve kısmen K_v ve K_{ir} kanallarının aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Takır ve ark. 2015a).

2.6.2. H₂S'in Vazokonstriktör Etkisi

Genel olarak H₂S, vazodilatasyona aracılık etse de bazı durumlarda vazokonstriksiyona neden olabilmektedir. Bu durumlara örnek olarak eNOS'un azalmasına bağlı NO düzeylerinin düşmesi veya O₂'nin parsiyel basıncının artması verilebilir (Geng ve ark. 2007; Kiss ve ark. 2008).

İnsan internal mamaryal arterinde (IMA) yapılan bir çalışmada düşük doz H₂S'in, muhtemelen NO ile etkileşmesi sonucu inaktif bir nitrosotiyolün oluşum mekanizması ile, damarları kastırıcı etki gösterdiği rapor edilmiştir (Webb ve ark. 2008). H₂S'in IMA'da olduğu gibi, serebral arterde de vazokonstriksiyon meydana

getirdiği bildirilmiştir. Bu etkiden sorumlu mekanizmanın cAMP/adenilat siklaz (AC) yolağının inhibisyonu olduğu düşünülmektedir (Li ve ark. 2015; Dongó ve ark. 2018).

2.7. H₂S'in Vasküler Etkileri ile İlişkili Mekanizmalar

H₂S ve donörlerinin damar tonüsünün düzenlenmesindeki rolleri, direkt olarak damar duvarını veya indirekt olarak renin-anjiyotensin sistemini (RAS) etkilemeleri ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Dongo ve ark. 2018).

H₂S'in vasküler tonüsün regülasyonunu sağlayan direkt etkilerinde aracılık eden mekanizmalar arasında, K⁺ kanal aktivasyonu, eNOS/cGMP/PKG yolağı, damar endoteli, NO ve CO ile etkileşimi, sitokrom C oksidaz inhibisyonu, ve perivasküler adipoz doku ile ilişkisi yer almaktadır.

2.7.1. Potasyum Kanallarının Aktivasyonu

H₂S'in çeşitli damarlardaki gevşetici etkisine aracılık eden K⁺ kanalları K_{ATP}, K_v, K_{ir}, BK_{Ca}²⁺, SK_{Ca}²⁺ ve IK_{Ca}²⁺'dır. Bu kanallar aktive olup açıldığında hücreden K⁺ çıkışı olur. Endotel veya düz kas hücrelerindeki pozitif yük kaybı hücreleri hiperpolarize ederek, voltaj bağımlı Ca²⁺ kanallarının inhibisyonuna ve hücre içi Ca²⁺ düzeylerinin düşmesine neden olur. [Ca²⁺]'daki azalma MHZK'yı inaktive edip, MP'yi aktif hale getirir. MP aktivasyonu ise MLC₂₀'yi defosforile eder ve böylelikle vazodilatasyon gerçekleşir (Dongó et al. 2018).

Sıçan mezenterik arteri, aorta ve koroner arterde yapılan bir çalışmada H₂S'in aracılık ettiği vazodilatasyonun mezenterik arter ve aortada kuvvetli olarak, koroner arterde ise kısmen K_{ATP} kanallarının aktivasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark. 2011). Ayrıca, H₂S, intraselüler pH değişikliklerine neden olarak K_{ATP} kanallarının aktivasyonunu düzenleyebilmektedir. Asidifikasyon vazodilatasyona, alkalinizasyon ise vazokonstriksiyona yol açmaktadır. H₂S'in, damar düz kas hücrelerindeki tamponlayıcı mekanizmalardan olan klor-bikarbonat değiştirici pompayı aktive ederek pH'yı düşürdüğü ve K_{ATP} aktivasyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (Liu ve ark. 2011; Gheibi ve ark. 2018).

Sıçan torasik aortasında ve sıçan koroner arterinde yapılan çalışmalarda ise; K_v kanal inhibitörü ile inkübe edilen damarlarda H₂S donörü NaHS ile elde edilen gevşeme

yanıtlarının kontrole kıyasla azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak bu damar yataklarında NaHS aracılı vazodilatasyonun kısmi olarak K_v kanallarının aktivasyonuna bağlı olduğu ortaya konmuştur (Cheang ve ark. 2010; Martelli ve ark. 2013).

H_2S 'in K_{Ca}^{2+} kanallarının tüm tiplerine etki ederek gevşeme yanıtı oluşturabildiği görülmektedir. H_2S , damarın endotel tabakasında eksprese olan SK_{Ca}^{2+} ve IK_{Ca}^{2+} kanallarını aktive ederek hiperpolarizasyonu başlatmaktadır. Endotel hücrelerinde meydana gelen bu değişim; bağlantı kavşak bölgeleri, K_{ir} veya Na^+/K^+ ATPaz aktivasyonu aracılığıyla düz kas hücrelerinde devam ettirilerek gevşeme yanıtı oluşturmaktadır. Bu doğrultuda; endotelden başlayan hiperpolarizasyonunun düz kasa iletilmesine aracılık eden H_2S 'in, EDHF gibi hareket ettiğini düşündürmektedir (Wang ve ark. 2015; Dongó ve ark. 2018).

BK_{Ca}^{2+} kanalları, hücre içi $[Ca^{2+}]$ 'un Ryanodin/SERCA yolağı aracılığıyla artması sonucu oluşan Ca^{2+} sparkları (ateşleme) ile aktive olmaktadır. Sıçan mezenterik arterinde yapılan bir çalışma, H_2S 'in BK_{Ca}^{2+} kanallarını aktive ederek vazodilatasyona yol açtığını göstermiştir. Bu çalışmada, CSE inhibisyonunun Ca^{2+} sparklarının sıklığında azalmaya yol açtığı, ekzojen H_2S 'in ise Ca^{2+} sparklarının sıklığını arttırmak suretiyle BK_{Ca}^{2+} kanallarını aktive ederek hiperpolarizasyon sağladığı ve gevşemeye yol açtığı gösterilmiştir (Nelson ve ark. 1995; Jackson-Weaver ve ark. 2013; Gheibi ve ark. 2018).

K_v ve K_{ir} kanallarının aktivasyonu NaHS'in izole sıgır retinal arterindeki gevşetici etkisine de kısmen aracılık etmektedir (Takır ve ark 2015a).

2.7.2. eNOS/cGMP/PKG Yolağının Düzenlenmesi

H_2S 'in damarlarda oluşturduğu direkt gevşetici etkisinin yanısıra, NO'nun vasküler gevşetici yanıtını da modüle ettiği belirlenmiştir. Kobay torasik aortasında yapılan bir çalışmada, endojen sülfidlerin NO aracılı vazodilatasyonu arttırdığı gösterilmiştir. CSE knockout farelerle yapılan bir başka çalışmada ise, H_2S eksikliğinin eNOS enziminin aktivitesini düşürdüğü, ekzojen H_2S 'in ise eNOS aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Hosoki ve ark. 1997; King ve ark. 2014). Bunların aksine, H_2S 'in sıçan aortasında L-arginin/NO yolağını baskılayarak NO sentezini azalttığı da bildirilmiştir (Geng ve ark. 2007; Dongó ve ark. 2018).

Sıçan aortasında yapılan bir diğer çalışmada, H₂S'in cGMP'yi arttırıcı etkisi araştırılmış ve H₂S donörleri tiyoglisin ve tiyovalin kullanılmıştır. Donörlerin cGMP'yi parçalayan fosfodiesteraz (PDE) ile disülfid bağı oluşturduğu, PDE enziminin aktivitesini engellenmesiyle vazodilatasyon sağladığı bildirilmiştir (Zhou ve ark. 2012; Dongó ve ark. 2018).

Sıçan aortasında ve HUVEC'te yapılan başka bir çalışmada ise CSE'nin, organ banyosunda inhibitörünün kullanılarak veya gen düzeyinde susturulması sonucu etkisinin azalması, her iki durumda da cGMP miktarını azaltmıştır. Bu durum H₂S'in cGMP'yi arttırdığını göstermektedir. Destekleyici olarak, endojen H₂S'in cGMP miktarını arttırıcı etkisi fosfodiesteraz (PDE) enzim inhibitörü varlığında azalmıştır. Bu veriler; H₂S'in PDE enzimini inhibe ederek cGMP'yi aktive ettiğini göstermektedir (Bucci ve ark. 2010; Gheibi ve ark. 2018).

H₂S ve NO'nun konjugasyonu ile hazırlanan donör ZYZ-803'ün gevşetici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; cGMP, PKG ve K_{ATP} inhibitörleri ile inkübe edilen arterlerde gevşeme yanıtının kontrole kıyasla anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Bulgular ZYZ-803'ün sıçan aortasında vazodilatör etkili olduğuna ve bu etkinin cGMP/PKG yolağının ve K_{ATP} kanallarının aktivasyonu ile gerçekleştiğine işaret etmektedir. (Wu ve ark. 2016; Dongó ve ark. 2018).

2.7.3. NO-CO-H₂S Etkileşimi ve Damar Endoteli

Gazotransmitterler birbirlerinin vasküler etkilerini değiştirebilmekte, arttırabilmekte ya da azaltabilmektedir. Damar yataklarındaki değişime bağlı olarak birçok farklı etkileşim örneği verilebilir. Sıçan torasik aortası ve portal veninde yapılan bir çalışmada NO'nun, H₂S'in damarları gevşetici etkisini arttırdığı; NO sentaz inhibitörü L-NAME kullanımının ise H₂S'in vazodilatör etkisini azalttığı gösterilmiştir (Hosoki ve ark. 1997; Zhao ve Wang 2002; Dongó ve ark. 2018). Bunlara ek olarak, NO'nun sıçan aortasında, CSE'nin ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2001b; Gheibi ve ark. 2018).

Elde edilen veriler, NO'nun H₂S'i etkileyebildiği gibi; H₂S'in de NO'nun damar yanıtlarını modüle edebildiğini göstermektedir. H₂S'in eNOS enzimini indükleyerek NO sentezini arttırdığı bildirilmiştir (Dongó ve ark. 2018; Gheibi ve ark. 2018). H₂S'in, eNOS haricinde, sıçan aortasında iNOS (indüklenebilir NOS) ve NO miktarında artış

sağlayarak vazodilatasyonu kuvvetlendirdiği belirlenmiştir (Jeong ve ark. 2006). Ancak, bu bulgulardan farklı olarak, domuz ve insan epitel hücreleri ile sıçan düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise H_2S 'in, hücre içi Ca^{2+} düzeyini düşürerek eNOS aktivasyonunu ve NO oluşumunu azalttığı da rapor edilmiştir (Kloesch ve ark. 2016). Benzer şekilde, H_2S 'in sıçan aortasında NO donörü sodyum nitroprussiyat (SNP) ile oluşan gevşeme yanıtını azalttığı, buna karşın SNP'nin H_2S donörü NaHS ile oluşturulan vazodilatör yanıtı değiştirmede gösterilmiştir (Dombkowski ve ark. 2005). Bununla birlikte, H_2S 'in SNP'ye bağlı gevşeme yanıtını arttırdığını gösteren bir çalışma da mevcuttur (Hosoki ve ark. 1997).

Endotel tabakasında gelişen hasarlanma sonucunda hem NO hem H_2S üretimi azalmaktadır. Ancak, H_2S düz kas tabakasında da üretildiğinden aktivitesine devam edebilmektedir. Adipoz dokunun bir hormonu olan leptin, endotel bağımlı olarak NO ve EDHF aracılığıyla gevşetici etki göstermektedir. Obez sıçanlarda meydana gelen hiperleptineminin mezenterik arterlerde NO aracılı vazodilatasyonu azaltırken EDHF aracılı yanıtı arttırdığı belirlenmiştir. Öte yandan, CSE inhibitörü ile inkübe edilen arterlerde EDHF'ye bağlı gevşeme yanıtı azalmıştır. Bu bulgular, EDHF'nin gevşetici etkisinde H_2S 'in rolünün olabileceğini düşündürmektedir (Jamroz-Wiśniewska ve ark. 2014; Dongó ve ark. 2018).

Sıçan koroner arterinde NaHS uygulamasının vazokonstriksiyona yol açtığı bir çalışmada; mekanik olarak deendotelize edilen ve eNOS inhibitörü ile inkübe edilen damarlarda NaHS'in vazodilatasyona neden olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar NO varlığında, H_2S 'in koroner damarlarda görülen vazokonstriktör etkisinin mekanizmasının H_2S 'in NO'nun etkisini azaltmasına bağlı olduğuna işaret etmektedir. Buna göre, H_2S 'in NO varlığında modulator, NO yokluğunda ise kompensatuvar olarak vazodilatör olduğu düşünülmektedir (Dongó ve ark. 2018). Bu yorumu destekleyici olarak, iskemik kalp hastalığı olan kişilerde yapılan çalışmada; hidrojen sülfid koroner damarları genişletirken, sağlıklı gönüllülerde böyle bir etki gözlenmemiştir (Kuo ve ark. 2016).

H_2S 'in damarlarda oluşturduğu vazokonstriktör ve vazodilatör yanıtlar iyon kanallarının modülasyonu ile ilişkili olup, genellikle endotelden bağımsız olarak meydana gelmektedir. Bununla birlikte, H_2S 'in vasküler etkisinin endotel bağımlı mekanizmalar ile gerçekleştiğini öngören çalışmalarda bulunmaktadır (Gheibi ve ark.

2018). Örneğin, sıçan aortasında ve sıçan mezenterik arterinde yapılan çalışmalarda endotel tabakasının yokluğunda H_2S 'e bağlı elde edilen gevşeme yanıtlarının kontrole kıyasla azaldığı bildirilmiştir (Zhao ve Wang 2002; Cheng ve ark. 2004). Ayrıca, CSE knock out farelerle yapılan çalışmada; H_2S 'in EDHF'ye benzer etki gösterdiği, CSE geninin silinmesiyle hiperpolarizasyonun bozulduğu, CSE ile elde edilen endotel bağımlı gevşetici etkinin kontrole kıyasla azaldığı rapor edilmiştir (Mustafa ve ark. 2011).

2.7.4. Sitokrom C Oksidaz İnhibisyonu

H_2S mitokondriyal kompleks I ve III'ü etkileyerek Ca^{2+} 'dan bağımsız bir mekanizmayla damarları gevşetebilmektedir. Yapılan çalışmalarda H_2S 'in mitokondrideki ATP sentezini bloke ederek aktin-myozin kenetlenmesini azalttığı veya AMP/ATP oranını arttırdığı ve bunlara bağlı olarak vazodilatasyon oluşturduğu bildirilmiştir (Kiss ve ark. 2008; Hedegaard ve ark. 2016). Sitokrom C oksidazın inhibisyonu H_2S 'in toksik etkilerinden birisi olsa da, H_2S 'in düşük konsantrasyonlarda mitokondrideki elektron taşıma zincirini uyardığı gösterilmiştir (Módis ve ark. 2014; Szabo ve ark. 2014; Dongó ve ark. 2018).

H_2S 'in sitokrom C oksidaz enzimini inhibe etmesi hücredeki ATP miktarını azalttığı için, bu azalmanın K_{ATP} kanal aktivasyonuna neden olarak damar düz kas hücrelerini hiperpolarize ettiği ve gevşetici etkiyi oluşturduğu düşünülmektedir (Cooper ve Brown 2008; Gheibi ve ark. 2018).

2.7.5. H_2S – Perivasküler Adipoz Doku İlişkisi

Periadventisyal (perivasküler) adipoz doku (PVAT), damarların etrafını sarıp damarlara yapısal destek sağlayan ve yapısında bulunan vazoaktif maddeler ile vasküler tonüsün regülasyonuna katkıda bulunan bir yapıdır. Adiposit kaynaklı gevşetici faktör (ADRF), PVAT'tan serbestleşen ve vazodilatör etkili olan bir maddedir. Bu maddenin etki mekanizmasının NO 'dan bağımsız, Ca^{2+} bağımlı ve kısmen K_{ATP} aktivasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. ADRF'nin etki mekanizmasından sorumlu olarak her zaman K_{ATP} aktivasyonu olmayabilir. Sıçan ile farelere ait mezenterik arterde ve aortada PVAT aracılı gevşemede K_v kanallarının aktivasyonunun (Schleifenbaum ve ark. 2010),

sıçan koronerinde ise Rho kinaz inhibisyonunun ve endotelial Ca^{2+} azalmasının rolü olduğu bildirilmiştir (Aalbaek ve ark. 2015).

PVAT varlığında izole damarlarda yapılan çalışmalar, PVAT'ın H_2S ürettiğini, H_2S 'in ADRF gibi etki ettiğini ve etkinin türe ve damar yatağına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir (Dongó ve ark. 2018; Gheibi ve ark. 2018).

H_2S 'in PVAT'ta eksprese olup ADRF gibi etki ettiğini gösteren bir çalışmada, CBS ve CSE enzimlerinin her ikisinin de aortaya ait PVAT'da bulunmakla birlikte, H_2S sentezinden asıl sorumlu yolağın L-sistein/CSE olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada sıçan periaortik dokusu L-sistein ve piridoksal fosfat ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda H_2S sentezlenmiş olup, CSE inhibitörleri varlığında H_2S 'in sentezinde yüksek oranda inhibisyon görülmüştür. Bu durum PVAT'taki H_2S sentezinin daha çok CSE aracılığıyla olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca yine aynı çalışmada, PVAT'da CSE aracılı H_2S üretiminin vazokonstriktör ajanların (fenilefrin, serotonin, anjiyotensin II) varlığında artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu artışın bu ajanların varlığında akut olarak gelişen vazokonstriksiyon sonucu meydana gelmiş olduğu, kronik hipertansiyonda da benzer bir düzenlemenin söz konusu olabileceği düşünülmüştür (Fang ve ark. 2009). Bu görüşü destekleyici olarak abdominal aorta koarktasyonu ile hipertansiyonun indüklendiği sıçanlarda, izole edilen periaortik adipoz dokuda CSE ekspresyonu ve H_2S üretiminin kontrol hayvanlardakine oranla arttığı bildirilmiştir (Fang ve ark. 2009; Gheibi ve ark. 2018).

H_2S 'in ADRF gibi etki ettiğini gösteren çalışmalara örnek olarak sıçan aortası ve mezenterik arterde yapılan çalışmalar verilebilir. Bu çalışmalarda gevşetici etkinin NO'dan bağımsız ancak, Ca^{2+} ve kısmi olarak K_{ATP} bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda PVAT'ın etkisi araştırılmamış olup; sadece PVAT ve H_2S 'in etki mekanizmasının benzerliğini örneklendirmek için H_2S 'in gevşetici etkisinin araştırıldığı çalışmaların bulguları paylaşılmıştır (Zhao ve ark. 2001a; Zhao ve Wang 2002).

2.7.6. Diğer Mekanizmalar

H_2S 'in vazodilatör etkisine aracılık ettiği düşünülen başka mekanizmalar da mevcuttur. Örnek olarak; fare kulaklarında kütanöz vazodilatasyonun TRPA1 aktivasyonu (Pozsgai ve ark. 2012), sıçan mezenterik arterindeki etkinin TRPV4 aktivasyonu (Naik ve ark. 2016), sıçan serebral arterindeki etkinin kısmi olarak

VOCC'ların inhibisyonu (Streeter ve ark. 2012) ve sıçan aortasında oluşan gevşetici etkinin ise $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ iyon değiştirici pompanın aktivasyonu ile (Kiss ve ark. 2008) gerçekleştiği rapor edilmiştir.

2.8. H_2S 'in Damar Tonüsü Üzerine Indirekt Etkileri

H_2S , damar düz kas tonüsünde lokal regülasyonuna aracılık eden çeşitli mekanizmalar üzerinden oluşan direkt etkilerinin yanı sıra, RAS ve sempatik sistem inhibisyonu üzerinden indirekt etkiler de oluşturmaktadır.

H_2S 'in RAS üzerine etkilerinin değerlendirildiği, renovasküler hipertansiyon geliştirilen sıçanlarda yapılan bir çalışmada, H_2S 'in renin hormonunun sentez ve salımını azaltarak reninin aktivitesini önlediği gösterilmiş ve renovasküler hipertansiyonda muhtemel tedavi edici rolünün olabileceği öngörülmüştür (Lu ve ark. 2010; Dongó ve ark. 2018).

H_2S 'in RAS üzerine etkisi sadece renin ile sınırlı olmayıp, HUVEC hücreleri ile yapılan bir çalışmada H_2S 'in, Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) üzerine inhibitör etkili olduğu gösterilmiştir (Laggner ve ark. 2007). H_2S 'in, ACE'nin inhibisyonu ile vazokonstriktör etkili olan Anjiyotensin II'nin miktarını azaltırken; aynı zamanda bradikininin parçalanmasını önleyip iki mekanizma ile vazodilatasyona katkı sağladığı bildirilmektedir (Laggner ve ark. 2007; Dongó ve ark. 2018).

RAS üzerindeki inhibitor etkisine benzer olarak H_2S , baroreseptör refleks mekanizma ile aktif hale gelen sempatik sistemi de inhibe edebilmektedir. Sıçanlarda yapılan bu çalışmada karotid sinüs kümülatif NaHS uygulaması ile perfüze edilmiş ve renal sempatik sinir aktiviteleri kaydedilmiştir. Buna göre, NaHS'in sempatik sinir sisteminin aktivitesini azalttığı ve bu etkiye K_{ATP} kanal aktivasyonu ve voltaj bağımlı L-tipi Ca^{2+} kanallarının blokajının da aracılık ettiği bildirilmiştir. (Guo ve ark. 2016; Dongó ve ark. 2018).

2.9. Gözün Anatomisi

Göz, orbita denilen göz çukurunda yer alan, küre şeklinde, yaklaşık 2,5 cm çapında ve 10 gr ağırlığında olan bir duyu organıdır. Göz, dıştan içe doğru 3 katmandan oluşur. Dıştaki tabaka tunica fibrosa (fibröz tabaka), ortadaki tabaka tunica vasculosa

(vasküler tabaka) ve içteki tabaka tunica sensoria (duysal tabaka) olarak isimlendirilir (Köylü 2016).

Tunica fibrosa, göz kasları için bir tutunma alanı oluştururken; aynı zamanda gözün şeklinin oluşumunu ve korunmasını sağlar. Opak ve beyaz olan arka kısım sklera, şeffaf olan ön kısım ise kornea olarak adlandırılır. Kornea ışığın göze girdiği bölümdür (Köylü 2016).

Tunica vasculosa, kan damarları ve pigmentleri içeren kısımdır. Pigmentleri barındırması nedeniyle, bu katmana gelen ışık yansıtılmayıp absorbe edilir. Vasküler tabaka da kendi içinde üç katmana ayrılır. Önden arkaya doğru bu katmanlar iris, corpus ciliare ve choroid'dir. İris, lensin (mercek) ön kısmında yer alır ve ortasında ışığın geçtiği bir açıklık bulunur. Bu açıklık pupilla (göz bebeği) adını alır. İris aynı zamanda yapısında bulunan musculus sphincter pupilla ve musculus dilatator pupilla kaslarıyla, kasılıp gevşeyen bir diyafram görevi görür. Corpus ciliare, vasküler tabanın ön kısmında bulunur ve yapısında otonom sinir lifleriyle innerve olan musculus ciliaris (silyer kas) kaslarını barındırır (Köylü 2016).

Gözün iç tabakası olan tunica sensoria ise gözün ışığa duyarlı kısmı olup retina olarak isimlendirilir. Retina tabakası yapısında; görme reseptörleri olan, renkli görmeyi sağlayan koni ile basil hücrelerini ve çeşitli nöronları barındırır. Retinanın arka kısmında, görmenin en iyi sağlandığı yer olan makula lutea (sarı leke) vardır. Makula luteanın orta bölümü gözün net görme alanıdır ve sadece koni hücrelerini içeren bu kısım, fovea centralis olarak isimlendirilir. Retinanın arkasında, nervus opticus (optik sinir) retinadan ayrılır. Optik sinirin retinadan ayrıldığı bölgeye optik disk (papilla) denir. Oval bir çukur olan optik disk, retinal damarların giriş-çıkış alanıdır. Bu yapıda koni ve basiller olmadığından, görme işlevinde katkısı bulunmaz ve kör nokta olarak isimlendirilir (Köylü 2016).

Lens, pupillanın arkasında konumlanmış konveks bir mercek olup, damar ve sinir içermez. Corpus ciliaredeki epitelden salgılanan humor aqueous (aköz humör) sıvısıyla beslenir (Köylü 2016).

Gözün içindeki boşluklar üçe ayrılmıştır: camera anterior (ön kamera), camera posterior (arka kamera) ve camera vitrea (vitröz kamera). Camera anterior ve posterior aköz humör sıvısını içerirken, lensin arkasındaki camera vitrea corpus vitreum (vitröz

humor/sıvı) ile doludur. Corpus vitreum yüksek oranda su içeren, jel kıvamında saydam bir sıvıdır. (Köylü 2016).

Göz küresi (bulbus oculi) ve göz ile ilgili diğer oluşumların bulunduğu boşluk alana orbita denir. Orbitada bulunan canalis opticus (optik kanal), n.opticus'un (optik sinir) ve retinal arterin kaynak aldığı a.opthalmica'nın (oftalmik arterin) geçiş yeridir (Arifoğlu 2017).

İnternal karotid arterin bir dalı olan arteria opthalmica (oftalmik arter), canalis opticustan orbitaya girdikten sonra dallarına ayrılır. Bu arterin dalları orbital ve optikal olarak sınıflandırılabilir. Optikal dalları lakrimal, supraorbital, ethmoidal ve palpebral arterler olarak isimlendirilirken; orbital dalları ise, siliyer, musküler ve retinal arter olarak ayrılır (Arifoğlu 2017; Gupta ve Singh, 2019).

2.9.1. Retinal Arter ile Retinanın Yapısal ve Fizyolojik Özellikleri

Oftalmik arterin ilk dalı olan a. centralis retina (merkezi retinal arter), optik diskten retina tabakasına girip dallarına ayrılan, fovea centralis ve retinanın iç katmanlarını kanlandıran bir damardır. Merkezi retinal arter optik diskten giriş yaptıktan sonra, retinanın iç kısmının üçte ikilik bölümünü beslemek üzere aşağıya doğru ve optik sinir kılıfı içinde ilerler. Ayrıca, kan-retina bariyerini oluşturan üst ve alt arkadlara ayrılır. Retinal arterin dalları venüllerle birlikte “vasa sanguinea retinae” ismini alır. Retinal arterin dalları retinada gittiği bölgelere göre adlandırılırlar. Parlak kırmızı renkli bu arterler pulsasyon göstermezler. Retinal arterin dalları dört kısımda incelenir (Arifoğlu 2017; Gupta ve Singh 2019):

- Arteriola nasalis superior ve inferior
- Arteriola temporalis superior ve inferior
- Arteriola macularis superior ve inferior
- Arteriola medialis retinae

Fizyolojik olarak önemli rolü olan merkezi retinal arterin tıkanması ani görme kaybına neden olabilir. Retinanın dış tabakalarının beslenmesi ise koroid tabakasından kaynak alan koryopakiller damarlar ile sağlanır (Gupta ve Singh 2019).

Tunica nervosa (sinir tabaka, ağ abaka) olarak da isimlendirilen retina tabakası saydam ve ince yapılı olup, dışta pars pigmentosa (pigment bölgesi) içte ise pars nervosa (sinir bölgesi) bölgelerinden oluşur. Dış yüzü koroid, iç yüzü vitröz humör ile temas halindedir. Arkadan öne doğru incelen retinanın, ön kısımda corpus ciliareye kadar uzanır, sonlandığı bölgeye ora serrata adı verilir.

Retina iki bölümde incelenir:

- Pars optica retinae: Discus opticus'tan ora serrataya kadar olan ve nöronların bulunduğu kısımdır.
- Pars ceaca retinae: Bu bölüm de kendi içinde pars ciliaris retinae ve pars iridica retinae olmak üzere ikiye ayrılır. Ora serrata ve iris arasındaki bölüm pars ciliaris retinae'yı, irisin arka kısmı da pars iridica retinae'yı oluşturur. Bu bölümler sinir hücrelerini barındırmaz (Arifoğlu 2017).

Gözün ışığa duyarlı tabakası olan retinanın yapısında çok sayıda nöron ve görüntülerin algılanmasını sağlayan koni ile basil hücreleri bulunur. Koni hücreleri renkli görmeden, basil hücreleri ise siyah-beyaz ve karanlıkta görüşten sorumludur. Koni veya basil hücreleri uyarıldığında oluşan sinyal öncelikle retinal nöronlardan geçer. Nöronlardan optik sinire iletilen sinyal ise serebral kortekse gönderilir ve görme olayı meydana gelir. Kısacası retinanın hem reseptör hem de nöronal işlevleri vardır (Guyton ve Hall 2007).

Retinanın dıştan içe doğru katmanları şu şekilde sıralanır (Şekil 2-1):

Pigment tabakası, basil ve koni hücreleri tabakası, dış nükleer tabaka, dış pleksiform tabaka, iç nükleer tabaka, iç pleksiform tabaka, gangliyon tabakası, optik sinir lifleri tabakası ve iç sınırlayıcı membran (Guyton ve Hall 2007).

Pigment tabakası melanin pigmentinin bulunduğu tabakadır. Melanin pigmenti ışığın yansımaları engelleyerek kontrast oluşturur ve görmede netliği sağlar. Işık merceği geçip vitröz humöre geldikten sonra retinaya iç kısmından girer. Bu durumda ilk geçtiği tabaka gangliyon, son ulaştığı ise koni ve basil (çomak) hücreleri tabakasıdır. Retinada keskin ve detaylı görmenin gerçekleştiği kısım foveadır. Bu bölge diğer koni hücrelerinden farklı olarak, sadece uzun ve ince gövdeli olarak özelleşmiş konilerden oluşmaktadır. Foveada retinanın diğer tabakaları yanlara doğru çekilmiştir. Bu sayede ışık direkt olarak koni hücrelerine ulaşır. Koni ve basillerin kanlanması koroidal

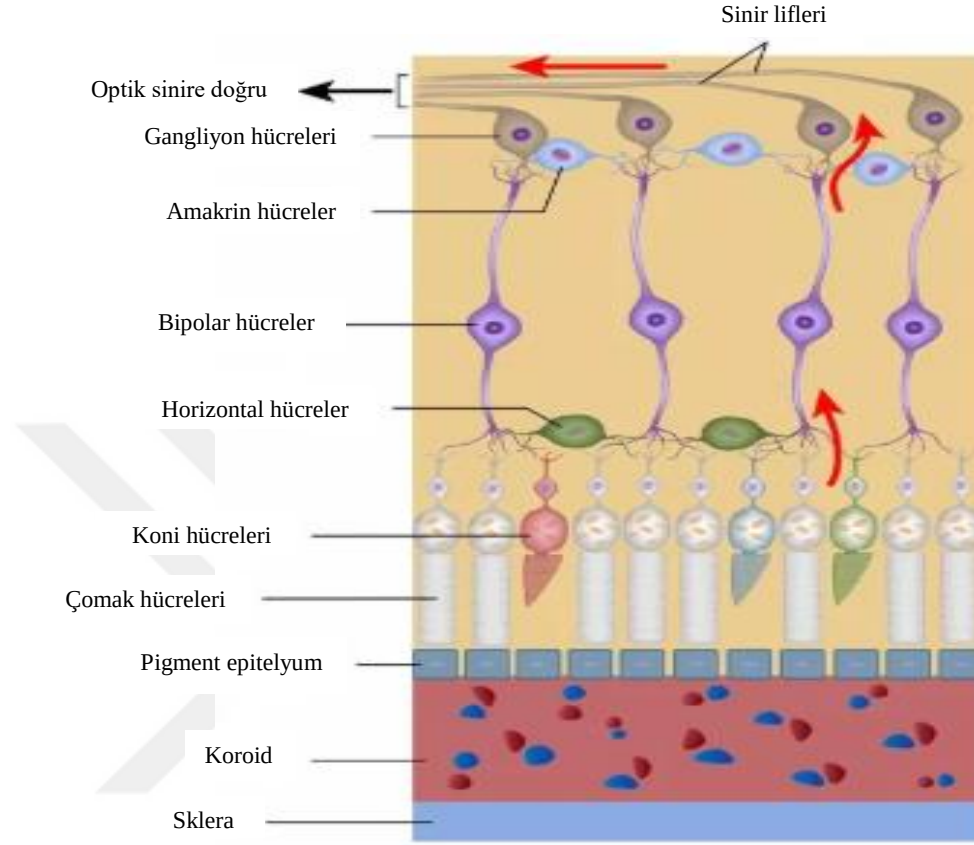
damarlar sağlar. Dış nükleer tabaka basil ve konilerin hücre gövdelerini barındırır (Guyton ve Hall 2007).

Retinal nöronlar ve işlevleri şu şekilde özetlenebilir:

- Basil ve koni hücreleri: Bipolar ve horizontal hücrelerle sinaps yaparlar, sinyalin dış pleksiform tabakaya iletilmesinde görevlidirler. Koni ve basil hücreleri tabakası dış segment, iç segment, nukleus ve sinaptik gövde olmak üzere 4 bölüme ayrılır. Dış segmentte fotokimyasallar vardır. İç segment sitoplazma ve organellerden oluşmaktadır. Sinaptik gövde kısmı ise horizontal ve bipolar hücrelerle yapılan bağlantı kısmıdır.
- Horizontal hücreler: koni ve basil hücrelerinden gelen sinyalin dış pleksiform tabakaya yatay olarak iletimini sağlar. Bu hücrelerin çıktıları daima baskılayıcı karakterde olup lateral inhibisyona neden olurlar. Böylelikle görsel imge uygun kontrastla iletilir ve keskin görmeye katkıda bulunulur.
- Bipolar hücreler: koni, basil ve horizontal kaynaklı iletilerin iç pleksiform tabakaya dikey olarak ulaştırılmasında, ayrıca gangliyonlarla ve amakrin hücrelerle sinaps gerçekleştirilmesinde görevli hücrelerdir. Hem stimülan hem de inhibitör özellikte sinyalleri oluşturabilirler.
- Amakrin hücreler: iletinin bipolar hücrelerden gangliyon hücrelerine dikey veya yatay olarak gönderilmesini ya da sinyalin diğer amakrin hücrelere iletilmesini sağlar. 30 tipte farklı amakrin hücre tanımlanmış olup işlevlerinin birbirinden ayrı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bu hücrelerin ara nöronlar olduğu ve görsel imgenin çözümlenmesine katkıda bulundukları sanılmaktadır.
- Gangliyon hücreleri: sinyalin optik sinir aracılığıyla beyne gönderilmesinde görevlidir. W, X ve Y olmak üzere 3 tipi vardır. W hücreleri basil görüşünün iletimini, X hücreleri görsel imge ve rengin iletimini, Y hücreleri ise görsel imgedeki anlık değişikliklerin iletimini sağlar (Guyton ve Hall 2007).

Retinal nöronların iletimde kullandıkları düşünülen nörotransmitterler çok çeşitlidir. Basil ile koni hücreleri ve bipolar hücreler glutamat nörotransmitterini

kullanılırlar. Amakrin hücrelerin ise (gama amino butirik asit) GABA, glisin, dopamin ve asetilkolin gibi nörotransmitterleri kullandıkları bilinmektedir (Guyton ve Hall 2007).



Şekil 2-2: Retinanın tabakaları
(discoveryeye.org)'dan değiştirilerek.

2.9.2. Retinal Sirkülasyonun Düzenlenmesi

Retinanın kanlanması sağlanan iki ayrı dolaşım sistemi vardır. Bunlar retinal ve koroidal dolaşımlardır. Retinal ve koroidal dolaşım anatomik ve fonksiyonel olarak bazı farklılıklar göstermektedir. Koroidal dolaşım otonom sinir sistemi tarafından düzenlenmektedir. Ancak retinal dolaşımda sempatik, parasempatik veya purinerjik innervasyon olmadığından retinal dolaşımın regülasyonunda lokal faktörler önem arz eder. Koroidal dolaşımın kan akımı yüksektir ve oksijen içeriği düşüktür buna karşın, retinal sirkülasyonun kan akımı düşüktür ve oksijen içeriği yüksektir (Delaey ve Van De Voorde 2000; Maenhaut ve ark. 2007; Daele ve ark. 2017).

Retinanın fovea bölgesinde kan damarları bulunmaz. Bu bölgenin besin ve oksijenle buluşması koroidal kaynaklardan difüzyon ile sağlanır. Retinanın diğer

bölgeleri ise hem retinal hem de koroidal dolaşım ile beslenir. Koroidal dolaşımın sorumlu olduğu alanlar retinanın pigment epitel tabakası ve fotoreseptörleri barındıran duysal retinanın dış kısımlarıdır. Retinal dolaşımda tıpkı kan-beyin bariyeri gibi, kan-retina bariyeri vardır. Retina bariyerinin dış kısmı retinal pigment epitelyum, iç kısmı ise endotel hücreleridir (Delaey ve Van De Voorde 2000).

Oküler dolaşım kompleks olup düzenlenmesinde birçok farklı lokal ve sistemik faktörler etkili olmaktadır. Retinal dolaşımda önemi olduğu düşünülen sistemik faktörlere anjiyotensin-II ve katekolaminler örnek olarak verilebilir. Ancak retinal arter tonüsünün düzenlenmesinde asıl baskın rolü olan, lokal faktörlerdir. Retinal kan akımını düzenleyen endotel kaynaklı faktörlerden bazıları şunlardır: NO, prostaglandinler, endotelin, adenzin (Delaey ve Van De Voorde 2000).

NO vazodilatasyonu sağlarken, prostaglandinlerin bazıları vazokonstriktör bazıları vazodilatör etkilidir. Endotelin-1 güçlü bir vazokonstriktör olup, reseptörlerinin koroidal ve retinal damarlarda bulunduğu bilinmektedir.

Endotel kaynaklı vazoaktif maddeler dışında; retinal arterin tonüsünün regülasyonunda rol aldığı düşünülen ve retinadan kaynaklanan, henüz yapısı tanımlanmamış olan vazodilatör etkili bir madde daha bulunmaktadır. Retinal gevşetici faktör (RRF) olarak isimlendirilen bu vazodilatör maddenin retinadan saıverilerek retinal arter tonüsünün düzenlenmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (Delaey ve Van De Voorde 1998, 2000). Retinal arter dışındaki bazı damarlar üzerinde de vazodilatör etkisi olduğu gösterilen RRF'in yapısıyla ilgili bilgiler sınırlıdır. Yapılan çalışmalar sonucu hidrofilik, ısıya ve tripsine dayanıklı olduğu, protein veya polipeptid yapısında olmadığı rapor edilmiştir (Delaey ve Van De Voorde 1998).

RRF'in gevşetici etkisinin endotelden (Delaey ve Van De Voorde 1998), NO ve PGI₂ gibi endotel kaynaklı vazoaktif maddelerden (Delaey ve Van De Voorde 1998; Takır ve ark. 2011) natriüretik peptitlerden (Boussery ve ark. 2005), adrenomedullin (Maenhaut ve ark. 2007) ve metil palmitattan (Takır ve ark. 2011) bağımsız olduğu belirlenmiştir. Retinal arterdeki gevşetici etkisinin bifazik bir karakter gösterdiği (Takır ve ark. 2011) ve RRF'in gevşetici etkisinin mekanizmasında Ca²⁺ duyarsızlaşmasının, Rho kinaz inhibisyonunun ve K_{ir} kanal aktivasyonunun rolü olduğu ortaya konmuştur (Takır ve ark. 2015a).

Ayrıca, RRF'in hipoksi, dorzolamid, adenozin, ATP, NMDA, GABA ve H_2S ile ilişkili diğer bazı vazodilatör yollarda da görev alarak vazodilatasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Daele ve ark. 2017).

Organizmada birçok dokuda yer aldığı belirlenen H_2S 'in oküler dokularda da bulunduğu ve retinal sirkulasyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Sığır gözünde yapılan bir çalışmada H_2S 'in korneada ve retinada en yüksek düzeyde bulunduğu ve CBS ile CSE enzimleri aracılığıyla endojen olarak sentezlendiği belirlenmiştir (Kulkarni ve ark. 2011). H_2S 'in retinal arterde vazodilatör etkisi olduğu gösterilmiştir. H_2S donörlerinden GYY4137'nin domuz retinal arterinde, NaHS'in ise domuz ve sığır retinal arterlerinde vazodilatör etkili olduğu gösterilmiştir (Takır ve ark. 2015b; Winther ve ark. 2015).

2.10. H_2S 'in Retinadaki Sentezi ve Retinal Hastalıklardaki Rolü

H_2S 'in retinada bulunduğu ve fizyolojik önemi olduğu düşünülmektedir. Retina tabakasında H_2S 'in endojen olarak sentezini sağlayan 3 temel enzim bulunmaktadır : CBS, CSE ve CAT/3-MST (Abe ve Kimura 1996; Hughes ve ark. 2009; Du ve ark. 2017). Yapılan çalışmalarda CBS ve CSE'nin semender retinasında, CSE'nin fare retinasında bulunduğu gösterilmiştir (Pong ve ark. 2007). Fare retinasında yapılan iki çalışmanın birisinde immünohistokimyasal yöntemlerle sadece 3-MST ve CAT'ın retinanın çeşitli tabakalarında eksprese olduğu rapor edilirken; diğer çalışmada CBS, CSE ve 3-MST enzimlerinin varlığı Western blot ve immünohistokimyasal yöntemler ile belirlenmiştir (Mikami ve ark. 2011; Gersztenkorn ve ark. 2016). Sığır retinasında spektrofotometrik yöntem ile H_2S 'in korneada ve retinada yüksek düzeyde bulunduğu, aköz hümorede ise bulunmadığı tespit edilmiştir. CBS ve CSE enzimlerinin spesifik inhibitörleri varlığında (AOAA ve PAG) retinada ölçülen H_2S düzeylerinin sırasıyla, %42-%56 düzeyinde kısmen azalması sığır retinasında H_2S sentezinde CBS ve CSE enzimlerinin rolünü ortaya koymuş ve aynı zamanda farklı yolların da rolünün olabileceğini düşündürmüştür (Kulkarni ve ark. 2011). Sığır retinasında CBS ve CSE enzimlerin varlığını moleküler veya immünohistokimyasal yöntemlerle gösteren bir çalışma ise bulunmamaktadır.

H_2S 'in retinadaki iyon kanalları üzerinde modülatör etki göstererek retinadaki iyon kanallarının fizyolojik işlevlerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Du ve ark.

2017). K_{ATP} kanalı inhibitörü glibenklamidin NaHS uygulanan sıçan retinal pigment epitel (RPE) hücrelerinde cAMP oluşumunu önlediği gösterilmiştir. cAMP'nin RPE hücrelerinin proliferasyon, apoptoz ve fagositozunda rolü olduğu öne sürülmektedir (Njie-Mbye ve ark. 2012).

Yoğun ışık maruziyetine bağlı fare retinasında geliştirilen fotoreseptör dejenerasyon hasarı çalışmasında, NaHS uygulanması ile fotoreseptör hücre apoptozunun ve DNA hasarının azaldığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada retinal lizatta hücre içi Ca^{2+} artışının CAT/3-MST aracılı H_2S sentezini inhibe ettiği ve ayrıca, H_2S 'in dış nükleer tabaka (outer nuclear layer-ONL) ve dış pleksiform tabakalarında (outer plexiform layer-OPL), yüksek miktarda K^+ ile uyarılan Ca^{2+} girişini sağlayan V-ATPaz'ı bloke ettiği gösterilmiştir. Fotoreseptörlerin apoptozu esnasında hücre içi Ca^{2+} miktarının arttığı bilinmektedir. H_2S ile Ca^{2+} arasındaki bu zıt ilişkinin fotoreseptörlerin yoğun ışığa maruziyeti sonucu gelişen apoptozdan korunmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Mikami ve ark. 2011).

H_2S 'in nörotransmitterler üzerine etkilerini inceleyen izole sığır ve domuz retinalarında yapılan bir çalışmada, NaHS ve Na_2S 'in yüksek düzeyde K^+ 'ya bağlı aspartat serbestleşmesini engelledikleri bildirilmiştir. Mekanizma henüz tam bilinmemekle birlikte, glutamat-aspartat taşıyıcısı ile ilgili, eksitotoksik glutamat hasarını engellemeye yönelik olarak, H_2S 'in retinada nörotransmisyonu düzenlediği düşünülmektedir (Opere ve ark. 2009; Du ve ark. 2017).

Sık görülen retinal hastalıklar olan retinitis pigmentosa (RP), yaşla ilişkili makula dejenerasyonu (AMD) ve glokomatöz retinal nöropati retinada irreversibl (geri dönüşsüz) hasara yol açarak görme fonksiyonunu olumsuz etkileyebilmektedir (Cottet ve Schorderet 2009; Du ve ark. 2017). Sığır ve domuz RPE hücrelerinde yapılan çalışmada NaHS ve endojen H_2S 'in RPE hücrelerinde cAMP düzeylerini arttırdığı (Njie-Mbye ve ark. 2010) gösterilirken, bir başka çalışmada ise bu artışın RPE'lerin fagositik aktivitesini baskılayarak RP ve AMD'yi kötüleştirdiği bildirilmiştir (Kuriyama ve ark. 1995).

Retinal nöronlarda veya görme fonksiyonunda hasara yol açan retinal damar hastalıklarının başında retinal arter oklüzyonu (RAO), retinal ven oklüzyonu (RVO) ve diyabetik retinopati gelmektedir. RAO ve RVO'nun gelişim sürecinde iskemi/reperfüzyon hasarının ve buna bağlı gelişen retinal gangliyon hücrelerinin

(RGC) kaybının önemli rolü vardır (Hayreh ve ark. 2004; Du ve ark. 2017). Kronik oküler hipertansif sıçanlarda yapılan bir çalışmada, hipertansiyona bağlı olarak H₂S, CBS, CSE ve 3-MST düzeylerinin azaldığı ve RGC'lerin hasarlandığı gözlenmiştir. NaHS uygulanması RGC'lerin sağ kalımını arttırmıştır (Du ve ark. 2017; Huang ve ark. 2017). Benzer şekilde, iskemi reperfüzyon hasarında önceden inhalasyon ile verilen H₂S tedavisinin RGC ölümünü azalttığı bildirilmiştir (Biermann ve ark. 2011). Yapılan bir diğer çalışmada, H₂S donörü ACS67'nin intravitreal enjeksiyonunun yüksek göz içi basıncından kaynaklanan retinal hasarı, RGC apoptozunu, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellediğini göstermektedir (Osborne ve ark. 2010).

Bu verilere ek olarak biz de önceki çalışmamızda H₂S'in sıgır retinal arterini kısmi olarak K_v ve K_{ir} kanallarının aktivasyonu aracılığıyla gevşettiğini göstermiştik (Takır ve ark. 2015a). H₂S'in retinal arter tonüsünün düzenlenmesinde rolünün olması, retinal vasküler hastalıklarda koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir (Du ve ark. 2017).

Diyabetik retinopati, görme keskinliğini azaltabilen ve körlüğe yol açabilen bir hastalıktır. Seyri esnasında glukoz yüksekliği nedeniyle perisit hasarı, kapiller blokaj ve buna bağlı vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) artışı sık görülen erken patolojik değişikliklerdir (Lu ve Adamis 2002). Bu değişiklikleri kan-retina bariyerinin yıkımı, makulada ödem, retina kapillerlerinde birikim ve yeni damar oluşumu takip eder (Du ve ark. 2017). Diyabetli sıçanlarda yapılan bir çalışmada retinada H₂S'in, CSE ve 3-MST mRNA'larının azaldığı gösterilmiştir. NaHS ile tedavi edildiklerinde kan-retina bariyerinde ve kapillerlerde düzelme, VEGF miktarı ve sinyalizasyonunda azalma meydana gelmiştir (Si ve ark. 2013). Buna karşın proliferatif diyabetik retinopatisi olan diyabetli hastalarda H₂S'in retinada yeni damar oluşumuna katkı sağladığı ve bu durumun diyabetik retinopatinin proliferatif olmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, H₂S ve VEGF'in paralel artışı, H₂S'in proliferatif diyabetik retinopatili retinanın oluşumunda pro-anjiyojenik rolü olabileceğine işaret etmektedir (Ran ve ark. 2014).

2.11. H₂S ve Ca²⁺ Duyarlılaşması Arasındaki İlişki

H₂S damar tonüsünün düzenlenmesinde önemli rolü olan ve çeşitli mekanizmalar aracılığıyla vazodilatör etki gösteren bir gazotransmitterdir. Ca²⁺ duyarlılaşması ise Ca²⁺

konsantrasyonunda bir değişiklik olmaksızın, MP enziminin inaktivasyonu aracılığıyla kasılma yanıtının potansiyalize edilmesidir. Bunun tam tersi durumda, MP'nin aktivasyonu halinde ise kontraktıl filamentlerin Ca^{2+} 'a duyarsız hale gelmesi ile vazodilatasyon oluşmaktadır.

H_2S ve Ca^{2+} duyarlılaşması arasındaki ilişkiyi damar düz kas hücrelerinde inceleyen çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Damar dışı düz kaslarda ve damar düz kaslarında H_2S 'in Ca^{2+} duyarlılaşma yolları üzerindeki etkilerini inceleyen deneysel çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

H_2S donörü NaHS, $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen fare gastrik fundus sirküler kaslarında doza bağımlı olarak gevşemeye neden olmuştur. Gastrik fundusta gevşemeye aracılık eden mekanizmanın endotel tabakası ve K^+ kanallarından bağımsız olduğu, kısmen MP aktivasyonuna bağılı olduğu; ancak Rho/Rho kinaz yolağıyla bir ilişkisinin bulunmadığı düşünülmektedir (Dhaese ve Lefebvre 2009).

Fare distal kolununda NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtının hücre Ca^{2+} düzeyleri ile birlikte incelendiğı bir çalışmada, gevşetici etkinin mekanizması K^+ kanalları ve endotel tabakası ile ilişkili bulunmamıştır. Bunula birlikte, distal kolon düz kasında NaHS aracılı gevşeme yanıtının başlangıcında sitozolik Ca^{2+} düzeylerinin arttığı ancak, gevşeme yanıtı maksimum düzeye ulaşp devam ettiğı esnada Ca^{2+} miktarında bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Buna bağılı olarak, NaHS aracılı vazodilatasyonun Ca^{2+} duyarsızlaşmasına neden olduğu; fakat bu değişikliğin MP aktivasyonu veya Rho kinaz inhibisyonu ile ilgili olmadığı rapor edilmiştir (Dhaese ve ark. 2010).

Spontan olarak veya kolinerjik agonist betanekol ile kastırılan sıçan jejenum sirküler düz kaslarında NaHS'in etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, doza bağımlı olarak uygulanan NaHS, kasılma yanıtlarını inhibe etmiştir. Bu inhibisyonun oluşum mekanizmasında, kısmi olarak K_{ATP} ve MP aktivasyonunun rolü olduğu düşünülmektedir (Nagao ve ark. 2012).

Domuz mesane boynu düz kaslarında H_2S 'in gevşetici etkisine aracılık eden yolların araştırıldığı çalışmada H_2S donörü GYY4137 kullanılmıştır. GYY4137'ye bağılı gelişen gevşemeye aracılık eden yolların K_{ATP} kanal aktivasyonu ve düz kasların Ca^{2+} 'a duyarlılığındaki azalmanın aracılık ettiğı rapor edilmiştir (Fernandes ve ark. 2013).

Fare penil korpus kavernosumunda ekzojen NaHS'in gevşetici etkisinin siklooksijenaz (COX), sitokrom P450, fosfolipaz A₂ (PLA₂), fosfodiesteraz IV ve Ca²⁺ duyarlılaşması ile ilgili Rho kinaz yolağı gibi birden fazla mekanizma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Rho kinaz inhibitörü ile inkübe edilen dokuda elde edilen gevşeme yanıtının kontrole kıyasla anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Aydinoglu ve Ogulener 2017).

Sıçan mezenterik arterinde H₂S donörü NaHS'in, Ca²⁺ miktarını azaltıp K⁺ kanallarını açarak ve Ca²⁺'dan bağımsız bir mekanizmayla mitokondriyal kompleks I ve III'ün aktivasyonu ile vazodilatasyon oluşturduğu gözlenmiştir (Hedegaard ve ark. 2016).

Tavşan, insan ve fare midelerinden izole edilen düz kaslarda endojen ve ekzojen H₂S'in düz kasları gevşettiği ve bu gevşetici etkiye aracılık eden mekanizmaların MP aktivasyonu ile, Rho kinaz ve PKC inaktivasyonu olduğu rapor edilmiştir (Nalli ve ark. 2015).

İnsan ve fare kolon düz kaslarında yapılan çalışmada CSE enziminin bu dokuda eksprese olduğu ve RhoA'nın H₂S nedeniyle sülfhidrasyona uğradığı gösterilmiştir. H₂S ile sülfhidrasyon, RhoA/Rho kinazın inhibisyonuna neden olarak düz kasların kasılma yanıtını baskılamıştır (Nalli ve ark. 2017).

Sıçan koroner arterinde yapılan bir çalışmada, diğerlerinden farklı olarak NaHS'in vazokonstriktör etkisinin mekanizması araştırılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda NaHS'e bağlı kasılma yanıtının hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunun artmasına ve kısmen Rho kinaz yolağının aktivasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Ping ve ark. 2015).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda, H₂S'in damar ve damar dışı düz kaslardaki etkileri ve bu etkilerden sorumlu Ca²⁺ duyarlılaşması ile ilgili mekanizmalar incelenmiştir. Ancak araştırılan mekanizmalar genel olarak MP aktivasyonu ve Rho kinaz yolağı ile sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte veriler çoğunlukla damar dışı düz kaslara ait olup damar düz kaslarında H₂S'in Ca²⁺ duyarlılaşması ile ilişkisini inceleyen tek çalışma mevcuttur. Söz konusu çalışmada da H₂S'in sıçan koroner arterinde vazokonstriktör etkisinin mekanizması araştırılmıştır. Buna göre, H₂S'in retinal arterdeki gevşetici etkisinde Ca²⁺ duyarlılaşması sağlayan yolların rolünü incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Buzdolabı +4°C (Haier)
- Buzdolabı -20°C (Arçelik)
- Buzdolabı -80°C (Haier)
- Distile su cihazı (Evoqua®)
- Disseksiyon mikroskobu (Zeiss)
- Soğuk ışık kaynağı (Zeiss)
- Myograf (DMT 620M, ADInstruments)
- PowerLab Cihazı (ADInstruments)
- Cerrahi aspiratör (Vakum pompası, Homeaspir)
- Vorteks (Heidolph®)
- Soğutmalı santrifüj (Hermle®)
- Homojenizatör (Isolab®)
- Nanodrop (protein miktarı ölçüm cihazı) Micro-Spectrophotometer (Nano-100, Hangzhou Allsheng Instruments®)
- Thermal cycler (Bio-Rad®)
- Elektroforez tankı (Mini protean tetra cell, Bio-Rad®)
- Jel elektroforezi güç kaynağı (Power supply Bio-Rad®)
- Transfer kaset sistemi (Bio-Rad®)
- ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad®)
- Microplate reader (Metertech®)
- Doku numunesi hazırlama cihazı (Leica®)
- Parafin yerleştirme istasyonu (HistoCore Arcadia H, Leica®)

- Soğuk plaka (HistoCore Arcadia C, Leica®)
- Mikrotom (Thermo Scientific Finesse®)
- Floresans mikroskop (Nikon® Upright mikroskop ECLIPSE Ni-U)

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları

- Etanol (Absolu ve %96'lık, Tekkim®)
- Metanol (Absolu, Tekkim®)
- Formalin (Tekkim®)
- Ksilen (Tekkim®)
- PGF_{2α} (10⁻⁴M, Dinolytic®)
- RIPA protein lizis tamponu (Santa cruz Biotechnology®)
- Laemmli buffer 2X (Bio-Rad®)
- 2-Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich®)
- Proteaz inhibitör kokteyli (Santa cruz Biotechnology®)
- Pageruler™ plus prestained protein ladder (Thermo fisher Scientific®)
- Tween 20 (Sigma®)
- Donkey serum (Sigma-Aldrich®)
- Fluoroshield mounting medium (Abcam®)
- ELISA kitleri (CBS, CSE ve 3-MST, MyBioSource®)

Potasyum klorür (KCl, Merck®): 10⁻²M konsantrasyondaki stok çözeltisi distile su ile hazırlanmıştır.

Noradrenalin hidroklorür (NA, Sigma-Aldrich®): 10⁻⁴M konsantrasyondaki stok çözeltisi 0,001 N HCl ile hazırlanmıştır. Oksidasyonu engellemek için her 1 ml için 1 mg askorbik asit ilave edilmiştir. Maddenin ışığa hassasiyeti göz önünde bulundurularak hazırlanan stok çözelti ve stok çözeltinin seyreltilmesiyle elde edilen dilüsyonlara ait tüpler, alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunmuştur.

Asetilkolin (Ach, Sigma-Aldrich®): 10^{-4} M konsantrasyondaki stok çözeltisi 0,001 N HCl (Hidroklorik asit) ile hazırlanmış olup ışıktan korunmuştur.

Sodyum nitroprusiyat (SNP, Sigma-Aldrich®): 10^{-4} M konsantrasyondaki stok çözeltisi distile su ile hazırlanmış olup ışıktan korunmuştur.

Kalsiyum klorür (CaCl_2 , Merck®): 10^{-2} M konsantrasyondaki stok çözeltisi distile su ile hazırlanmıştır.

Sodyum hidrosülfid (NaHS, Sigma-Aldrich®): 10^{-2} M konsantrasyondaki stok çözeltisi distile su ile hazırlanmıştır ve ışıktan korunmuştur.

(R)-(+)-trans-4-(1-Aminoetil)-N-(4-Pyridil)sikloheksan karboksamid dihidroklorid (Y-27632, Sigma-Aldrich®): 10^{-6} M konsantrasyondaki stok çözeltisi distile su ile hazırlanmıştır.

1-(5-Kloronaftalensulfonil)homopiperazin hidroklorid (ML-9, Tocris®): 10^{-5} M konsantrasyondaki stok çözeltisi dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlanmıştır. DMSO konsantrasyonu % 0.1'i aşmamış olup, damarların kasılma veya gevşeme yanıtları üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ön çalışmalarda gösterilmiştir .

Calyculin A (MP Biomedicals®): 10^{-7} M konsantrasyondaki stok çözeltisi etanol (% 96) ile hazırlanmıştır. Etanol çözücüsünün konsantrasyonu % 0.1'i aşmamış olup, damarların kasılma veya gevşeme yanıtları üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ön çalışmalarda gösterilmiştir .

Calphostin C (Sigma-Aldrich®): 10^{-6} M konsantrasyondaki stok çözeltisi etanol (% 96) ile hazırlanmıştır.

(3,4-Dihidroksibenziliden)-malononitril (Tyrphostin 23, TRC®, Toronto Research Chemicals): 10^{-4} M konsantrasyondaki stok çözeltisi aseton ile hazırlanmıştır. Aseton çözücüsünün konsantrasyonu % 0.1'i aşmamış olup, damarların kasılma veya gevşeme yanıtları üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ön çalışmalarda gösterilmiştir.

Süt tozu non-fat dried milk (Sigma-Aldrich®): %5'lik çözeltisi TBST (Tris buffered saline-Tween 20) ile çözündürülerek hazırlanmıştır.

Tris/Glisin/Sodyum dodesil sülfat (SDS) (TGS buffer 10X, Bio-Rad®): Distile su ile 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Tris Buffered Saline (Tris tamponlu tuz, TBS buffer 10X, Bio-Rad®): Distile su ile 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Western blot için primer antikorlar: RhoA, Rho kinaz II, beta-aktin (Santa cruz Biotechnology®), p-MYPT, p-CPI-17, CPI-17 (Merck Milipore®), MYPT1 (Thermo fisher Scientific®)

Protein yüklü membranın inkübasyonunda kullanılan primer antikor içeren çözelti 10 ml olarak hazırlanmıştır. 10 ml'lik çözeltinin 9 ml'sini TBST, 1ml'sini %5'lik süt tozu ve 10 µl'sini primer antikorlar oluşturmaktadır. Hazırlanan çözelti 4°C'de muhafaza edilmiş ve en fazla üç deneyde kullanılmıştır.

Western blot için sekonder antikorlar: Goat anti rabbit, Goat anti mouse, Mouse anti goat (Santa cruz Biotechnology®)

Protein yüklü membranının inkübasyonunda kullanılan sekonder antikor içeren çözelti 10 ml olarak hazırlanmıştır. 10 ml'lik çözeltinin 9 ml'sini TBST, 1ml'sini %5'lik süt tozu ve % 1µl'sini sekonder antikorlar oluşturmaktadır. Hazırlanan çözelti 4°C'de muhafaza edilmiş ve en fazla üç deneyde kullanılmıştır.

Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad®): Western blot deneylerinde membranın görüntülenmesi amacıyla A ve B solüsyonları 1/1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır ve ışıktan korunmuştur.

İmmünohistokimya için primer antikorlar : CBS ve CSE (Santa cruz Biotechnology®)

İmmünofloresans mikroskopik analizlerde kullanılan primer antikor içeren çözeltiler 100 µl olarak hazırlanmıştır. 100 µl'nin 90 µl'sini TBS 1X, 10 µl'sini blokaj çözeltisi ve % 0,5'lik kısmını 0,5 µl'sini primer antikorlar oluşturmaktadır. Bu çözelti kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmış ve tek sefer kullanılmıştır.

İmmünohistokimya için sekonder antikorlar : Donkey anti-rabbit IgG H&L (Alexa fluor® 488), Donkey anti-goat IgG H&L (Alexa fluor® 594), (Abcam®)

İmmünofloresans mikroskopik analizlerde kullanılan sekonder antikor içeren çözeltiler 100 µl olarak hazırlanmıştır. 100 µl'nin 90 µl'sini TBS 1X, 10 µl'sini blokaj çözeltisi ve 0,25 µl'sini sekonder antikorlar oluşturmaktadır. Bu çözelti kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmış, ışıktan korunmuş ve tek sefer kullanılmıştır.

3.1.3. Laboratuvar Malzemeleri

- Cerrahi malzemeler (Pens, makas, göz makası, doku makası)
- Cam malzemeler (petri kutusu, balon joje, beher, şişe)
- Mikropipet (Eppendorf®, 10, 100 ve 1000 µl'lik)
- Enjektör (10 ml'lik)
- Spatül
- Lam
- Lamel
- Western blot transfer membranı (Immun-Blot PVDF Membran, Bio-Rad®)
- 4-15% Western blot hazır protein jeli (10 kuyucuk, 50 µl), (Bio-Rad®)
- Western blot absorban kağıt (Bio-Rad®)
- Western blot transfer sünger (Fiber pad, Bio-Rad®)

3.1.4. Kullanılan Bilgisayar Yazılım Programları

- GraphPad-Prism 5.0 programı
- LabChart 8 (ADInstruments)
- Powerlab Normalizasyon programı (ADInstruments)
- ImageJ 1.50i yazılım programı
- NIS-Elements 5.02 yazılım programı

3.2. Kullanılan Yöntemler ve Deney Protokolleri

3.2.1. Myograf Sisteminde NaHS'in Retinal Arter Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

3.2.1.1. Retinal Arterin İzolasyonu ve Standardizasyonu

Mezbahada, yeni kesilen kasaplık hayvanlardan (Montafon ve Simental cinsi sığır, 2-4 yaş, her iki cinsiyet) izole edilen gözler, buzlu soğuk Krebs Ringer-Bikarbonat (KRB) çözeltisinin (mM olarak; NaCl: 135, KCl: 5, NaHCO₃: 20, Glukoz: 10, CaCl₂: 2.5, MgSO₄.7H₂O: 1.3, KH₂PO₄: 1.2, EDTA: 0.026) bulunduğu bir taşıma

kabı ile hızla laboratuvara getirilmiştir. Gözler ekstraoküler kaslardan ve bağ dokularından ayrıldıktan sonra, lensin 0.5 cm gerisinden kesilip ikiye ayrılmış ve gözün arka bölümü bir petri kutusuna alınmıştır. Ardından gözün arka segmentinde bulunan vitröz hüümör retinaya zarar vermeksizin, uzaklaştırılmış ve yerine soğuk KRB çözeltisi doldurulmuştur. Bu işlemi takiben, diseksiyon mikroskobu (Zeiss 2000) yardımıyla merkezi retinal arterden preparatlar hazırlanıp, her biri 40 µm çapında iki paslanmaz çelik telden geçirilmek suretiyle, KRB çözeltisi içeren myografin (DMT&ADInstruments; Model 620M) doku tutucuları arasına yerleştirilmiştir (uzunluk: 1,70±0,01 mm, iç çap (Do): 222,7±3,19 µm; n=112). 4 kanallı myograf sistemine (banyo hacmi: 4ml) yerleştirilen damarlar %95 O₂ + %5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılarak ve her 10 dakikada (dk) bir KRB çözeltileri yenilenerek, 37°C'de 1 saat (sa) süreyle dengelenmeye bırakılmıştır. 1 sa'lik sürenin sonunda damarlara uygulanan gerim, mikrometre yardımıyla kademeli olarak her 2 dk'da bir arttırılmış ve pasif damar duvar gerimi - iç çevre ilişkisine göre; fizyolojik koşullarda tamamen gevşemiş damarın içinden geçen kanın damar duvarına yaptığı basıncın (transmural basınç; 13,3 kPa (100mmHg)) %90'ına karşılık gelen iç çevre belirlenmiştir. Normalizasyon olarak tanımlanan bu işlem ile myograf sisteminin doku tutucuları arasındaki retinal arterlerin gerimi mikrometre yardımıyla bu düzeye getirilmiştir (Mulvany ve Halpern 1977). Damarlar bu ön gerim ile 30 dk süreyle tekrar dengelenmeye bırakılmıştır. Dengelenmenin ardından damarlar, KCl (120 mM) ve NA (10⁻⁴M) içeren çözelti ile 2 defa kastırılarak standardize edilmiştir. Bu uygulama sonucunda 0.5mN/mm'den daha az kasılan damar segmentleri deneyden çıkarılmıştır. Damarların endotel ve düz kas gevşeme yanıtlarını test etmek amacıyla; prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}, 3x10⁻⁵M) ile kastırılan retinal arterlere sırasıyla, asetilkolin (Ach, 10⁻⁸M - 10⁻⁴M) ve sodyum nitroprusiyat (SNP, 10⁻⁸M - 10⁻⁴M) çözeltileri kümülatif olarak uygulanmıştır. Myograf sisteminde, retinal arter yanıtlarına (kasılma ve gevşeme) ait izometrik gerim kayıtları LabChart 8 (ADInstruments) yazılım programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.2. NaHS'in Etki Mekanizmasının İncelenmesi

NaHS'in etkisi PGF_{2α} (3x10⁻⁵M) ile kastırılan retinal arterlerde konsantrasyon bağımlı (10⁻⁵M-3x10⁻³M) olarak incelenmiştir. Ardından retinal arterde NaHS ile elde

edilen gevşetici etkinin olası etki mekanizmaları araştırılmıştır. Bu çalışmada özellikle, daha önce irdelenmemiş olan, ekstrasellüler kalsiyum (Ca^{2+}) ve Ca^{2+} duyarlılaşması ile ilgili yolların rolü araştırılmıştır.

NaHS'in retinal arteri gevşetici etkisinde ekstrasellüler kalsiyumun rolü, KRB çözeltisinden CaCl_2 'ün çıkartılarak 0,5 mM etilen glikol tetraasetik asit (EGTA, 0.5mM) ilave edilmesiyle hazırlanan kalsiyumsuz ($\text{Ca}^{2+}(-)$) ortamda araştırılmıştır. Bu deneylerde, retinal arterler kalsiyumsuz KRB çözeltisiyle (mM olarak; NaCl: 135, KCl: 5, NaHCO_3 : 20, Glukoz: 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1,3, KH_2PO_4 : 1,2, EGTA: 0,5) 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) veya kalsiyum klorür (CaCl_2 , 10^{-2}M) ile kastırılan retinal arterlere artan konsantrasyonlarda NaHS (10^{-5}M - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) uygulanmış ve elde edilen gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir (Takır ve ark. 2015a). Ekstrasellüler Ca^{2+} 'un rolünün değerlendirildiği deneylere paralel olarak, damar düz kasının Ca^{2+} 'a karşı duyarlılığı üzerinde NaHS'in etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla, kalsiyumsuz ortamda NaHS ($3 \times 10^{-3}\text{M}$, 30 dk) ile inkübe edilen ve 20 mM KCl ile depolarize edilen retinal arterlerde, kümülatif olarak CaCl_2 (10^{-5} - 10^{-2}M) uygulanması ile gelişen kasılma yanıtları değerlendirilmiştir. Elde edilen yanıtlar, kalsiyumsuz ortamda NaHS ile inkübe edilmeden elde edilen CaCl_2 (kontrol) yanıtları ile karşılaştırılmıştır (Freitas ve ark. 2009; Takır ve ark. 2015b).

NaHS'in retinal arteri gevşetici etki mekanizmasını aydınlatmak üzere, hücre içi kontraktıl proteinlerin kalsiyuma karşı duyarlılaşmasına aracılık eden myozin hafif zincir kinaz (MHZK), protein kinaz C, rho kinaz, tirozin kinaz ve myozin fosfataz (MP) yolları ile ilişkisi araştırılmış ve bu doğrultuda sırasıyla, MHZK inhibitörü ML-9 (10^{-5}M , 20 dk) (Kamiya ve ark. 2014), protein kinaz C inhibitörü calphostin C (10^{-6}M , 20 dk) (Jensen 1996), rho kinaz inhibitörü Y-27632 (10^{-6}M , 20 dk) (Chitaley ve Webb 2002; Aalbaek ve ark. 2015), tirozin kinaz inhibitörü tyrphostin 23 (10^{-4}M , 20 dk) (Evans ve ark. 1999) ve MP inhibitörü calyculin A (10^{-7}M , 20 dk) (Hilgers ve ark. 2007; Takır ve ark. 2015b) varlığında etkisi araştırılmıştır. Bu deneylerde, belirtilen inhibitörlerle inkübe edilen ve edilmeyen (Kontrol) retinal arterler $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile kastırılmış ve ardından kümülatif olarak artan konsantrasyonlarda NaHS (10^{-5}M - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) uygulanarak elde edilen gevşeme yanıtları kıyaslanmıştır.

3.2.2. Western Blot Yöntemi ile Kalsiyum Duyarlılaşması ile İlişkili Yolaklara Ait Protein Düzeylerinin Ölçülmesi

NaHS'in retinal arter üzerindeki gevşetici etkisini aydınlatmak üzere, Ca^{2+} duyarlılaştırması ile ilişkili olduğu bilinen RhoA/Rho kinaz, MP ve CPI-17 yolaklarının muhtemel rolü bu enzimlerin protein düzeylerinin moleküler düzeyde Western Blot tekniği ile test edilmesiyle değerlendirilmiştir (Hedegaard ve ark. 2016; Nalli ve ark. 2015; Nalli ve ark. 2017; Ping ve ark. 2015; Yan ve ark. 2015). Bu amaçla, izole edilen retinal arterler; kontrol (hiçbir inkübasyon uygulanmamış), $PGF_{2\alpha}$ ($10^{-4}M$, 20 dk inkübasyon uygulanmış) ve $PGF_{2\alpha}+NaHS$ ($10^{-4}M$, 20 dk + $10^{-3}M$, 20 dk inkübasyon uygulanmış) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Her gruptaki arterler öncelikle RIPA tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli ile homojenize edilmiş ve ardından santrifüj ile süpernatantlar ayrılmıştır. Herbir gruba ait süpernatantların protein konsantrasyonları nanodrop ile ölçülmüştür. Ölçülen konsantrasyonlardan % 10-15'lik SDS-PAGE jelin her bir kuyucuğuna eşit miktarda protein yüklenmesi için gereken doku homojenatı hacmi hesaplanmıştır. Proteinler, jele yüklenmeden önce $95^{\circ}C$ 'de 5 dk ısıtılarak denatüre edilmiştir. Bu esnada elektroforez tankı migrasyon tamponu (TGS-1X) ile doldurulmuştur. Denatüre edilen proteinler ve protein ladder jel üzerindeki kuyucuklara yüklenmiştir. Proteinler elektroforez ile moleküler ağırlıklarına göre bantlar halinde ayrıştırılmış ve bantların doğruluğu protein ladder ile karşılaştırılmıştır (migrasyon). Ardından bantlar halinde ayrıştırılan proteinler PVDF (Poliviniliden diflorür) membran üzerine metanol içeren tampon çözelti (TGS 1X + %20 metanol) kullanılarak ıslak transfer metodu ile aktarılmıştır. Transfer kasedine öncelikle transfer tamponu ile ıslatılan transfer sünger, absorban kağıt ve jel yerleştirilmiş, bu esnada membran absolu metanol ile 5 dk boyunca aktive edilmiştir. 5 dk sonrasında jelin üzerine sırasıyla membran, absorban kağıt ve transfer sünger transfer çözeltisiyle ıslatıldıktan sonra yerleştirilmiş ve tabakalar arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilmiştir. Transfer tamponu ile doldurulan elektroforez tankına yerleştirilen kasetlere 1,5 sa. süre ile elektrik akımı verilmiş ve proteinlerin jelden membrana geçmeleri sağlanmıştır. Antikorların non-spesifik bağlanmalarını önlemek amacıyla membrana transfer edilen proteinlere, %5'lik süt tozu ile oda sıcaklığında 1 sa süre ile blokaj yapılmıştır. Blokajdan sonra TBST (Tris-buffered saline TBS 1X + 0.1% Tween 20) ile 3 defa 5 dk süreyle yıkanan membran, primer antikorlar (seyreltme oranı 1/1000) ile $4^{\circ}C$ 'de gece

boyu inkübe edilmiştir. Bağlanmayan yapılar TBST çözeltisi ile 5 dk aralıklarla 3 kez yıkanmak suretiyle uzaklaştırıldıktan sonra membran; sekonder antikor (seyreltme oranı 1/10000) ile 1 sa boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yıkama işlemini takiben, membran üzerindeki özgül bağlanmaları tespit etmek için sekonder antikor ile konjuge olan enzimle (HRP-horse radish peroksidaz) reaksiyona girip, sinyal oluşturarak kemilüminesans ışıma yapan substratları içeren ECL (arttırılmış kemilüminesans) çözeltisi kullanılmıştır. Karanlık ortamda, ECL çözeltisiyle muamele edilen membranın yaptığı kemilüminesans ışıma, ChemiDoc™ XRS+System cihazı ile görüntülenip kaydedilmiştir. Blokajdan itibaren aynı işlemler, protein miktarlarını normalize etmek amacıyla dokuda var olduğu bilinen bir protein (Beta-aktin, loading kontrol) için tekrarlandıktan sonra, protein bantlarına ait optik dansite ImageJ 1.50i yazılım programı kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamada, membranda görüntülenen ve varlığı araştırılan protein ile Beta-aktin proteinine ait bantların yoğunluğu ImageJ 1.50i ile ölçülmüştür. İlgili proteine ait ölçülen optik yoğunluk değeri Beta-aktin yoğunluk değerine bölünerek normalize edilmiştir. Böylece her proteine ait relatif yoğunluk hesaplanmıştır. Relatif yoğunluklar hesaplandıktan sonra, deney grupları arasındaki ekspresyon değişimleri (artma veya azalma olarak) belirlenen istatistiksel analiz (Student's t) ile anlamlılık yönünden kıyaslanmıştır. Verilen tüm değerler 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

3.2.3. ELISA Yöntemi ile H₂S'i Sentezleyen Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu deneylerde, H₂S'in retina ve retinal arterdeki rolünü ortaya koymak üzere, sentezine aracılık eden CBS, CSE ve 3-MST enzimlerinin retina ve retinal arterdeki düzeylerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Enzimlerin ölçümünde sıgır dokusuna spesifik ELISA kitleri kullanılmıştır. Öncelikle retina ve retinal arter dokularından protein ekstraksiyonu yapılmış ve ELISA kitlerinin üretici firmasının (Mybiosource®) talimatlarına göre deney protokolü gerçekleştirilmiştir.

Protein ekstraksiyonu için, mezbahadan alınıp soğuk KRB çözeltisi içinde laboratuvara taşınan gözlerden retina ve retinal arter izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen dokular, en az 100'er mg miktarda biriktirilene kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Yeterli doku miktarları toplandıktan sonra protein ekstraksiyon protokolüne geçilmiştir.

Ekstraksiyon için retina ve retinal arter PBS (phosphate buffered saline) çözeltisi (mg başına 10 µl) ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat +4°C'de, 5000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilmiş ve ardından protein içerikli süpernatant ELISA deneylerinde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

H₂S'i sentezleyen enzimlerin retina ve retinal arterdeki kantitatif analizi için kullanılacak ELISA kitleri +4°C'de saklanmıştır. Deney prosedürü uygulanmadan önce kitteki tüm çözeltiler ve protein içeren örnekler oda sıcaklığına getirilmiştir. Kite ait standartlar, örnekler ve kontrol gruplarının kuyucuklara nasıl yükleneceği önceden planlanmış ve ardından tüm gruplara ait proteinler primer antikor ile kaplanarak 96'lık mikropalakaya 50 µl hacimde çift tekrarlı olarak yüklenmiştir. Örneklerin yüklenmesini takiben, her kuyucuğa 100 µl HRP (Horse radish peroksidaz enzimi) konjugatı eklenmiş ve 37°C'de 1 sa boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon bittiğinde plaka, yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkanarak bağlanmayan yapıların uzaklaşması sağlanmıştır. Yıkamadan sonra kromojen solüsyonlar (Ave B'den 50'şer µl) kuyucuklara eklenmiş ve karanlık ortamda 37°C'de 15 dk süreyle inkübe edilmiştir. 15 dk sonra reaksiyonu durdurmak amacıyla her kuyucuğa 50 µl stop çözeltisi eklenmiştir. Stop çözeltisinin ilavesi kuyucuklardaki mavi rengin sarıya dönüşümünü sağlamıştır. Renk değişiminin ardından absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucuda (Accureader, Metertech®) ölçülüp değerlendirilmiştir. Standartlara ait absorbans ve konsantrasyon değerleriyle elde edilen grafiğin denklemi oluşturulduktan sonra, absorbansları ölçülen örneklerin konsantrasyonları denklem yardımıyla belirlenmiştir. Sonuçlar pg/mg doku olarak hesaplanmıştır. Verilen tüm değerler 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

3.2.4. İmmüno Floresans Mikroskopik Analiz ile H₂S'i Sentezleyen Enzimlerin Gösterilmesi

Bu deneylerde, H₂S'in retina ve retinal arterdeki rolünü ortaya koymak üzere, immüno floresans mikroskopik analiz yöntemi ile H₂S sentezine aracılık eden CBS ve CSE enzimlerinin retina ve retinal arterdeki varlığı ve dağılımları incelenmiştir (Gersztenkorn ve ark. 2016).

Mezbahadan temin edilen sıgır gözleri soğuk KRB çözeltisi içerisinde hızla laboratuvara transfer edilmiştir. Ekstraoküler yapılar pens ve makas aracılığıyla temizlendikten sonra immünohistokimyasal analizlerin yapılabilmesi ve lam üzerine

alınabilmesi için gerekli kesitlere uygun bir form oluşturacak şekilde izolasyonlar yapılmıştır. Retina ve retinal arterin tek başlarına doku takip ve parafine gömme aşamalarında stabil olmamaları nedeniyle, retinal arteri içeren retina tabakası bir bütün olarak koroid ve sklera tabakalarıyla birlikte izole edilmiştir. İzolasyonun ardından kasetlere koyulan numuneler, doku numunesi hazırlama cihazına yerleştirilmiş ve rutin takip işlemi uygulanmıştır. Takip işlemi esnasında doku örnekleri sırasıyla formalin (1 sa), etanol %70 (45 dk), etanol %80 (45 dk), etanol %90 (45 dk), etanol %96 (45 dk), absolu etanol (2 sa), ksilen (2,5 sa), parafin (3 sa) serilerinden geçirilerek dehidrasyon, şeffaflandırma ve infiltrasyon işlemlerine tabi tutulmuştur (toplam süre: 11,5 sa). Rutin takip işleminin ardından cihazdan çıkarılan kaset içindeki numuneler parafin yerleştirme istasyonuna (HistoCore Arcadia H, Leica®) taşınmıştır. 60°C’de sıvı hale getirilmiş parafin, numuneye uygun kalıplara (mould) doldurulmaya başlandıktan sonra, numune retina ile retinal arterin tabakalarının görünmesini sağlayacak şekilde pens yardımıyla dikey olarak kalıplara yerleştirilmiş ve parafine gömülmüştür. Gömme işlemini takiben eriyen parafinin yeniden donmasını sağlamak amacıyla numune içeren kalıplar soğuk plakaya (HistoCore Arcadia C, Leica®) taşınmıştır. Parafin iyice donduktan sonra mikrotom (Thermo Scientific Finesse®) ile 7µm’lik kesitler alınmış ve 41-42°C’ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilmiştir. Su banyosunda yüzen kesitler lam üzerine alındıktan sonra, oda sıcaklığında kurumaya bırakılarak lama iyice tutunmaları sağlanmıştır. Deney esnasında kesitin lam üzerinden ayrılmasını önlemek amacıyla, deney protokolüne başlanmadan önce lamlar etüvde 50°C’de 15 dk boyunca bekletilmiş ve ardından deparafinizasyon işlemine geçilmiştir. Deparafinizasyon için lamlar sepete yerleştirildikten sonra sırasıyla ksilen (2x10 dk), absolu etanol (10 dk), %96’lık etanol (5 dk), %80’lik etanol (5 dk) ve %70’lik etanol (5 dk) içeren kaplardan geçirilmiş ve sonrasında 5 dk boyunca distile su ile muamele edilerek dehidrasyonu sağlanmıştır. Dehidrasyonun ardından deney protokolüne başlanmış olup, lamlar öncelikle yıkama ve antikorların hazırlanmasında kullanılan TBS-1X (TBS-10X’ten distile su ile seyreltilmiştir) ile 2 defa 5 dk süre ile yıkanmıştır. Yıkamayı takiben non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla numuneler, blokaj tamponu (%10’luk eşek serumu + TBS-1X + %0,6 Tween 20) ile 45 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 45 dk sonra, blokaj çözeltisinden uzaklaştırılması amacıyla lamlar TBS-1X ile 3 tekrar halinde 5 dk yıkanmıştır. Blokajın ardından numuneler primer antikor (CBS tavşan , CSE keçi, 1/200 dilüsyon oranı, Santacruz Biotechnology®) ile gece boyu, karanlıkta 4°C’de

inkübe edilmiştir. Ertesi gün yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlanmış ve floresans ışıma yapan boyalarla konjuge edilen sekonder antikorlar ile işaretleme aşamasına geçilmiştir. CBS deney grubu için yeşil ışıma yapan donkey anti-rabbit IgG H&L (Alexa fluor® 488, Abcam®), CSE deney grubu için ise kırmızı ışıma yapan donkey anti-goat IgG H&L (Alexa fluor® 594, Abcam®) antikorları 1/400 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Sekonder antikor ile 1 sa inkübe edilen dokular TBS 1X ile yıkandıktan sonra, 5 dk boyunca distile su ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından distile su iyice uzaklaştırılmış, kesitlerin üzerine boyutlarına göre 1-2 damla floroshield mounting medium damlatılmış ve 5 dk beklenmiştir. 5 dk sonra içeride hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kesitin üzeri lamel ile kapatılmıştır. Lamelin hareket etmesini önlemek amacıyla iki kısa kenarına tırnak cilası tatbik edilmiştir. Cila kuruduktan sonra retina ve retinal arterin yaptığı ışımlar floresans mikroskobu (Nikon® Upright mikroskop ECLIPSE Ni-U, M570 E) ile gözlenmiş ve NIS-Elements 5.02 yazılım programı ile kaydedilmiştir. Verilen tüm değerler 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

3.3. İstatistiksel Analiz

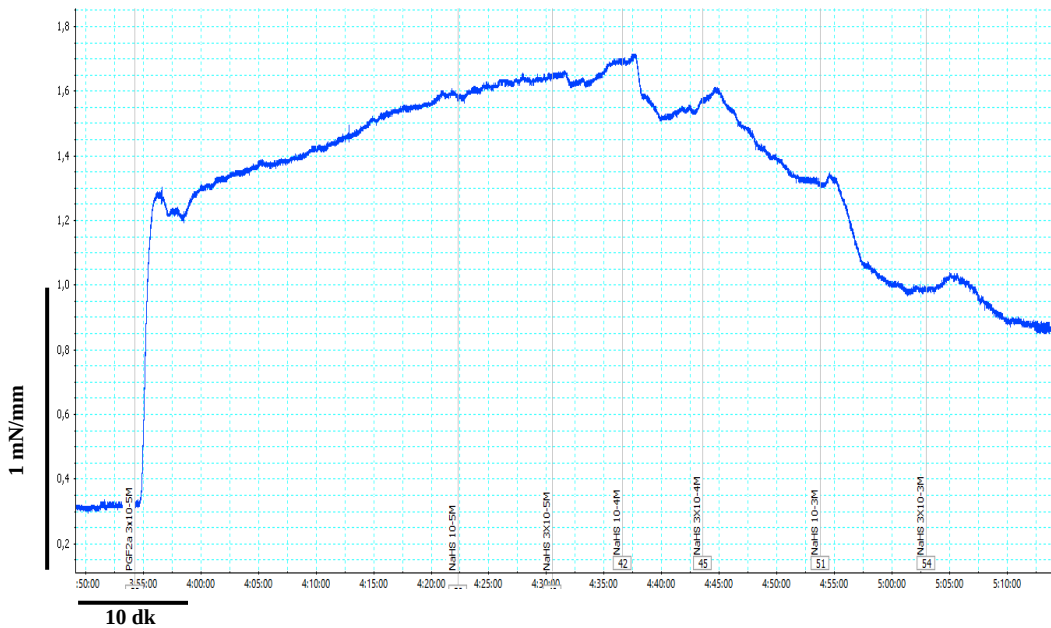
Veriler "ortalama $\pm$ standart hata" olarak gösterilmiştir. "n", deneylerde kullanılan sığır retinal arterlerinin sayısını ifade etmektedir. Damarlarda kastırıcı ajanlarla elde edilen kasılma yanıtları "mN/mm" olarak, önceden kastırılmış (prekontrakte edilmiş) dokularda NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtları ise kasılmaya (prekontraksiyona) göre yüzde (%) olarak belirtilmiştir. E_{maks} değeri, deneylerde kullanılan çeşitli vazoaaktif ajanların uygulanmasıyla elde edilen maksimum kasılma veya gevşeme yanıtını, pEC_{50} değeri; maksimum konsantrasyonun uygulanması ile elde edilen maksimum yanıtın (kasılma veya gevşeme) %50'sini oluşturan konsantrasyonun (-) logaritma değerini göstermektedir. Deney grupları arasındaki istatistiksel farkın anlamlılık düzeyinin değerlendirilmesi için "Student's t testi" (iki eş arasındaki farkın anlamlılık testi ve gruplar arası farkın anlamlılık testi) uygulanmıştır. "p" değeri "0,05" den küçük olan karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

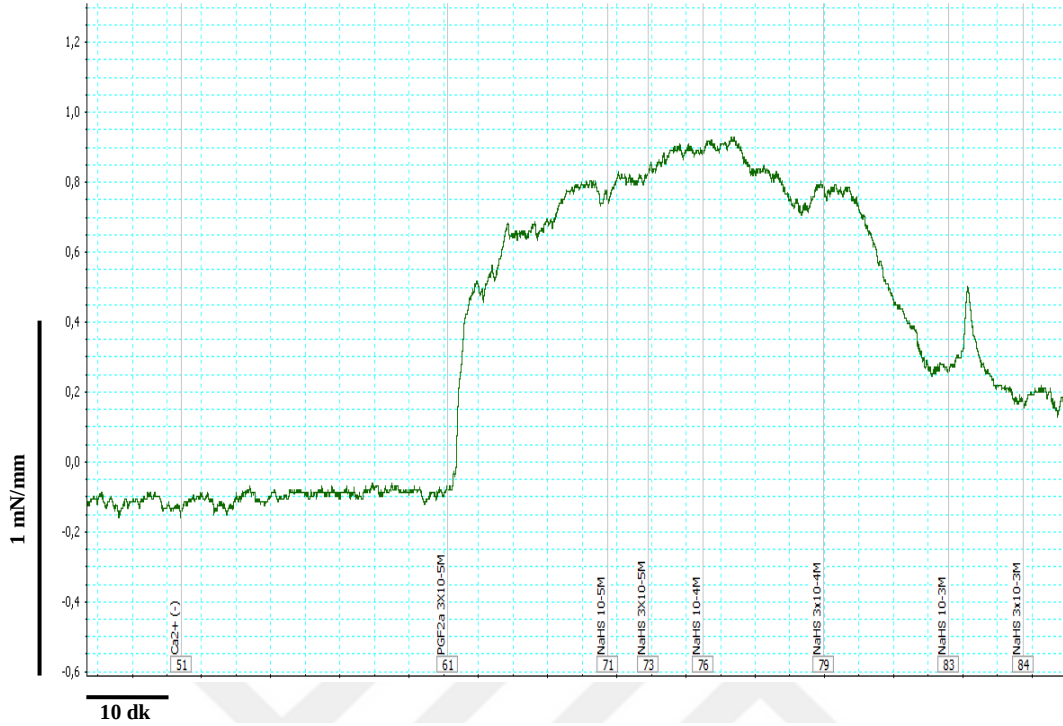
Damarların endotel ve düz kas gevşeme yanıtlarını test etmek amacıyla; $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile kastırılan retinal arterlere, asetilkolin (Ach, 10^{-8}M - 10^{-4}M) ve sodyum nitroprusiyat (SNP, 10^{-8}M - 10^{-4}M) çözeltileri kümülatif olarak uygulanmıştır. $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile prekontrakte edilen damarlara Ach (10^{-8}M - 10^{-4}M) ve SNP (10^{-8}M - 10^{-4}M) uygulanması konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtları oluşturmuştur (Ach E_{maks} : $\%34,45 \pm 4,72$, SNP E_{maks} : $\%44,48 \pm 2,80$; $n=10$).

4.1. NaHS'in Sığır Retinal Arterini Gevşetici Etkisinde Ekstraselüler Kalsiyumun Rolünün Değerlendirilmesi

Kalsiyumsuz ortamda ($\text{Ca}^{2+}(-)$), $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) ile kastırılan retinal arterlere kümülatif olarak NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3} \text{M}$) uygulanması ile elde edilen gevşeme yanıtları, kalsiyum içeren ($\text{Ca}^{2+}(+)$) ortamda elde edilen maksimum gevşeme yanıtlarıyla benzer bulunmuştur. Paralel olarak, $\text{Ca}^{2+}(-)$ ve $\text{Ca}^{2+}(+)$ ortamda elde edilen NaHS yanıtlarının pEC_{50} değerleri arasında da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4-1 ve 4-2, Tablo 4-1). Ayrıca, $\text{Ca}^{2+}(-)$ ve $\text{Ca}^{2+}(+)$ ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile indüklenen kasılma yanıtları (prekontraksiyon düzeyleri) sırasıyla, $0,63 \pm 0,11 \text{ mN/mm}$ ($n=6$) ve $0,70 \pm 0,16 \text{ mN/mm}$ ($n=6$) olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4-1: $\text{Ca}^{2+}(+)$ ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile kastırılan sığır retinal arterinde NaHS'in (10^{-5} - $3 \times 10^{-3} \text{M}$) oluşturduğu gevşeme yanıtını gösteren orjinal trase.



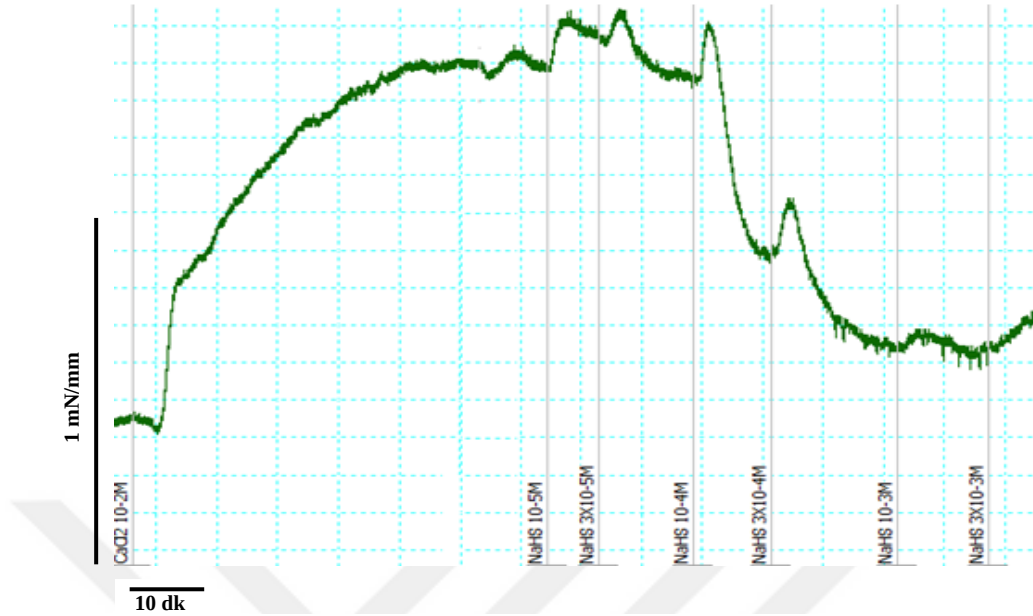
Şekil 4-2: $\text{Ca}^{2+}(-)$ ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile kastırılan sığır retinal arterinde NaHS'in (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) oluşturduğu gevşeme yanıtını gösteren orjinal trase.

Tablo 4-1: $\text{Ca}^{2+}(-)$ ve $\text{Ca}^{2+}(+)$ ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ile kastırılan retinal arterlere NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) uygulanması ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları ve pEC_{50} değerleri

NaHS aracılı gevşeme yanıtları			
	$E_{\text{maks}} (\%)$	$\text{pEC}_{50} (-\log \text{M})$	n
$\text{Ca}^{2+}(+)$	64.38 ± 5.74	$4,16 \pm 0,16$	6
$\text{Ca}^{2+}(-)$	73.73 ± 10.13	$4,17 \pm 0,08$	6

$p > 0.05$, $\text{Ca}^{2+}(-)$ ve $\text{Ca}^{2+}(+)$ ortamda elde edilen NaHS yanıtları karşılaştırıldığında

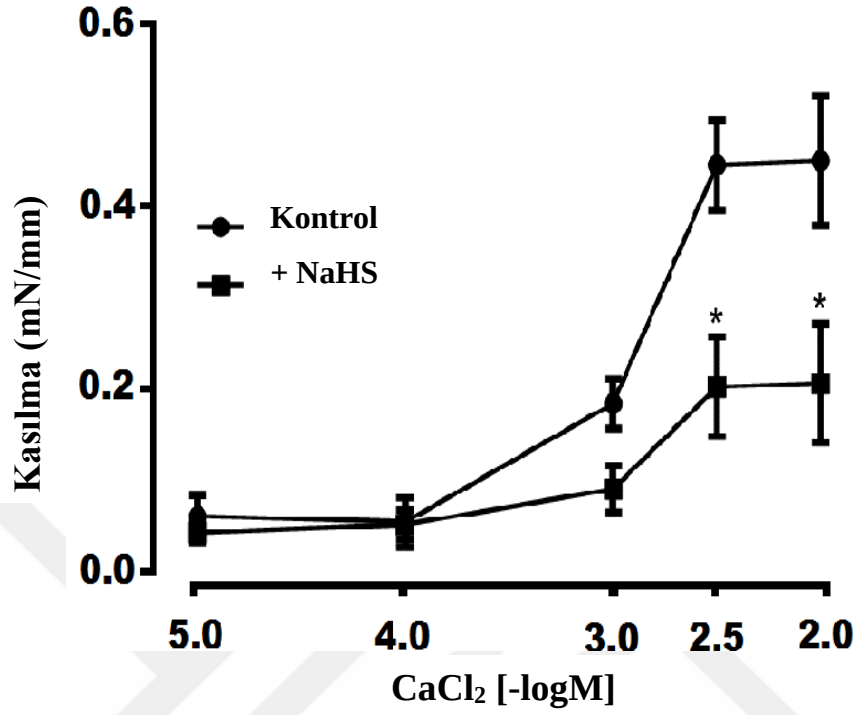
Öte yandan, $\text{Ca}^{2+}(-)$ ortamda CaCl_2 (10^{-2}M) ile kastırılmış olan izole retinal arterler üzerine NaHS uygulanması konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtlarına neden olmuştur (E_{maks} : $\%71.41 \pm 4.24$; pEC_{50} : $4,02 \pm 0,13$; $n=9$), (Şekil 4-3). Bu gevşeme yanıtı $\text{Ca}^{2+}(-)$ ortamda $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile kastırılmış retinal arterlerde elde edilen yanıtla kıyaslandığında, E_{maks} ve pEC_{50} değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$).



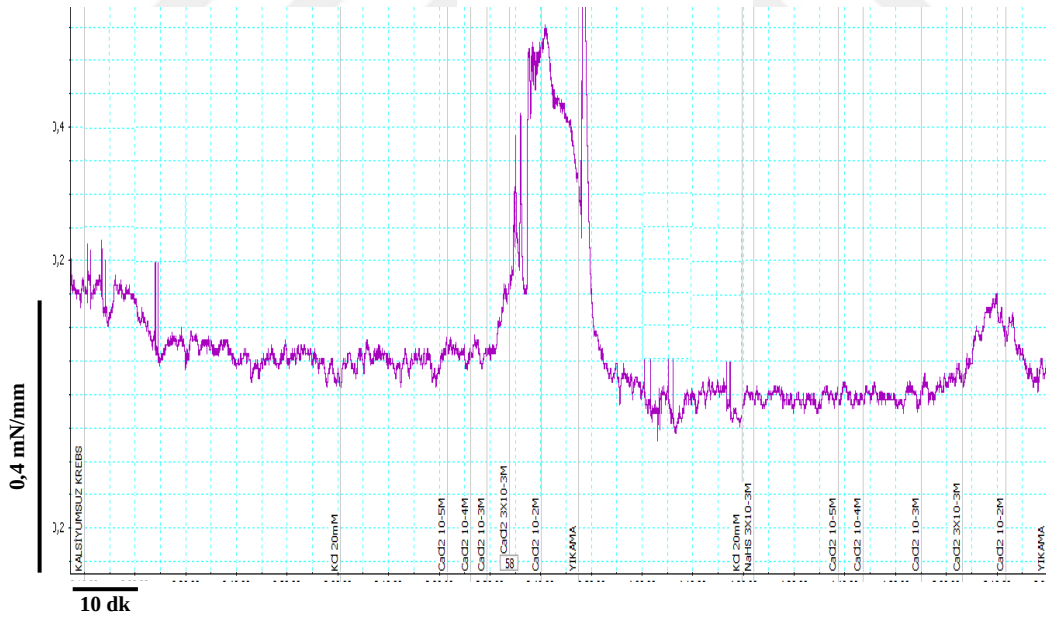
Şekil 4-3: CaCl_2 (10^{-2}M) ile kastırılan retinal arterde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) uygulaması ile elde edilen konsantrasyon bağımlı gevşeme yanıtını gösteren orjinal trase.

Retinal arterlerin NaHS ($3 \times 10^{-3}\text{M}$, 20 dk) ile inkübasyonu; CaCl_2 'ün (10^{-5} - 10^{-2}M) konsantrasyon bağımlı kasılma yanıtlarının maksimumunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (+NaHS E_{maks} : 0.20 ± 0.05 mN/mm vs Kontrol E_{maks} : 0.45 ± 0.05 mN/mm, $n=11$; $p<0.05$) (Şekil 4-4). Bununla birlikte, CaCl_2 'ün pEC_{50} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır (+NaHS pEC_{50} : 3.59 ± 0.26 vs Kontrol pEC_{50} : 3.46 ± 0.16 ; $n=11$, $p>0.05$). $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen retinal arterlerde NaHS ile elde edilen maksimum gevşetici etki $3 \times 10^{-3}\text{M}$ konsantrasyonda elde edildiği için, bu inkübasyon deneylerinde de NaHS $3 \times 10^{-3}\text{M}$ konsantrasyonda uygulanmıştır.

A)



B)

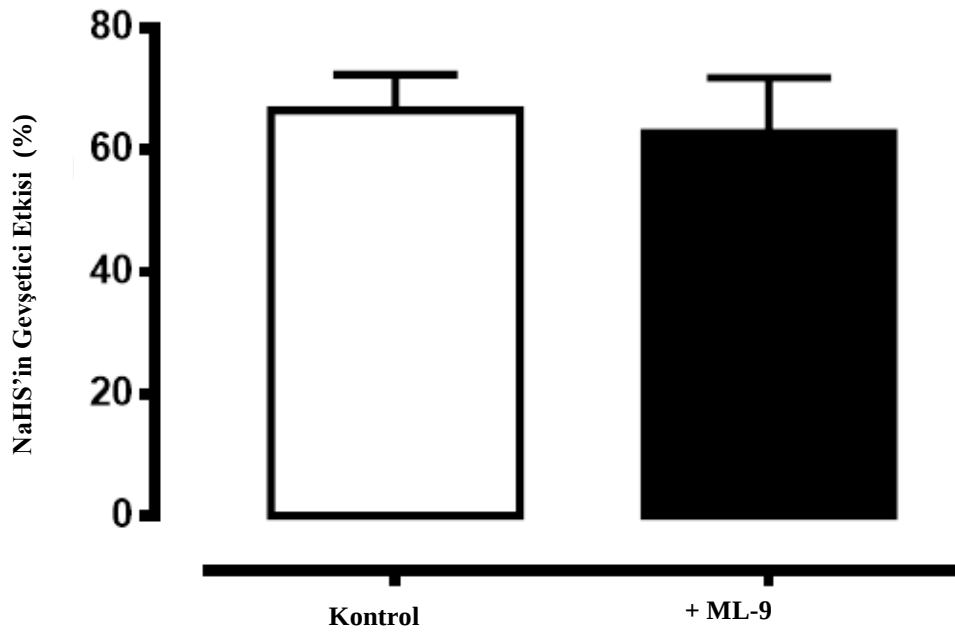


Şekil 4-4: A) İzole sığır retinal arterlerinin NaHS ($3 \times 10^{-3} \text{M}$, 20 dk) ile inkübasyonunun CaCl_2 (10^{-5} - 10^{-2}M) ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisi üzerine etkisi, $n=11$; $p<0.05$. B) NaHS inkübasyonu ile CaCl_2 kasılmalarında elde edilen inhibitör etkiyi gösteren orjinal trase.

4.2. NaHS'in Retinal Arteri Gevşetici Etkisinde Kalsiyum Duyarlılaşması ile İlgili Mekanizmalar

4.2.1. MHZK Yolağının Rolünün İncelenmesi

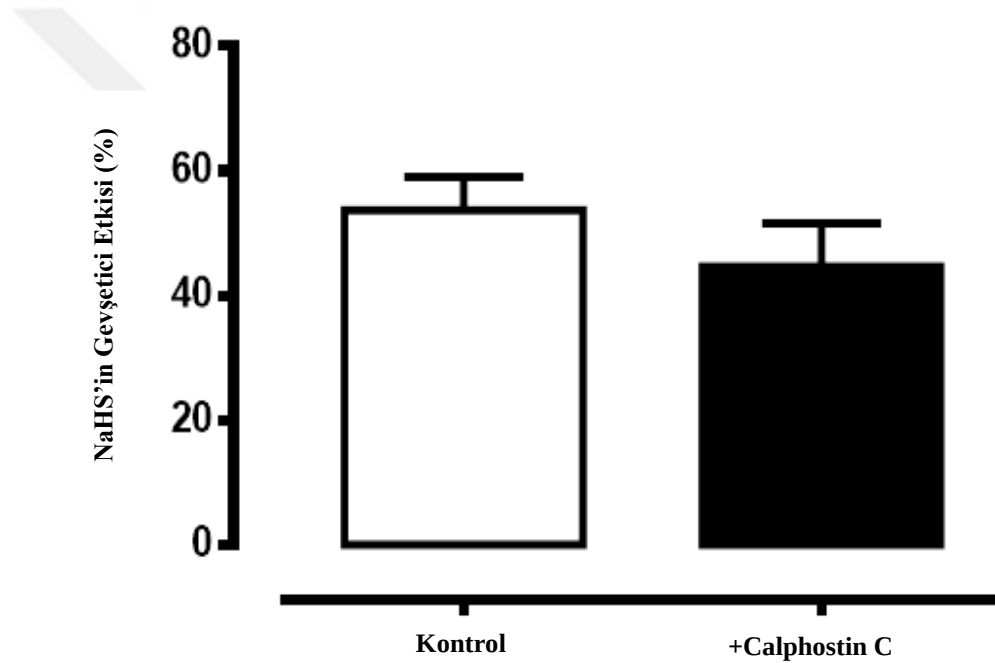
NaHS 'in sıgır retinal arterini gevşetici etkisinde MHZK yolağının rolü, MHZK inhibitörü ML-9 (10^{-5} M, 20 dk) varlığında incelenmiştir. Retinal arterin ML-9 ile inkübasyonu $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontraksiyon sonrasında uygulanan NaHS (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'in maksimum gevşeme yanıtlarında ve pEC_{50} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır (+ML-9 E_{maks} : 62.75 ± 9.05 vs Kontrol E_{maks} : 66.46 ± 5.85 $n=10$, $p>0.05$; +ML-9 pEC_{50} : 4.55 ± 0.13 vs Kontrol pEC_{50} : 4.42 ± 0.11 ; $n=10$ $p>0.05$) (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: MHZK inhibitörü ML-9 inkübasyonunun (10^{-5} M, 20 dk), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile kastırılan retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - 3×10^{-3} M) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtı üzerindeki etkisi, $n = 10$; $p > 0.05$.

4.2.2. PKC Yolağının Rolünün İncelenmesi

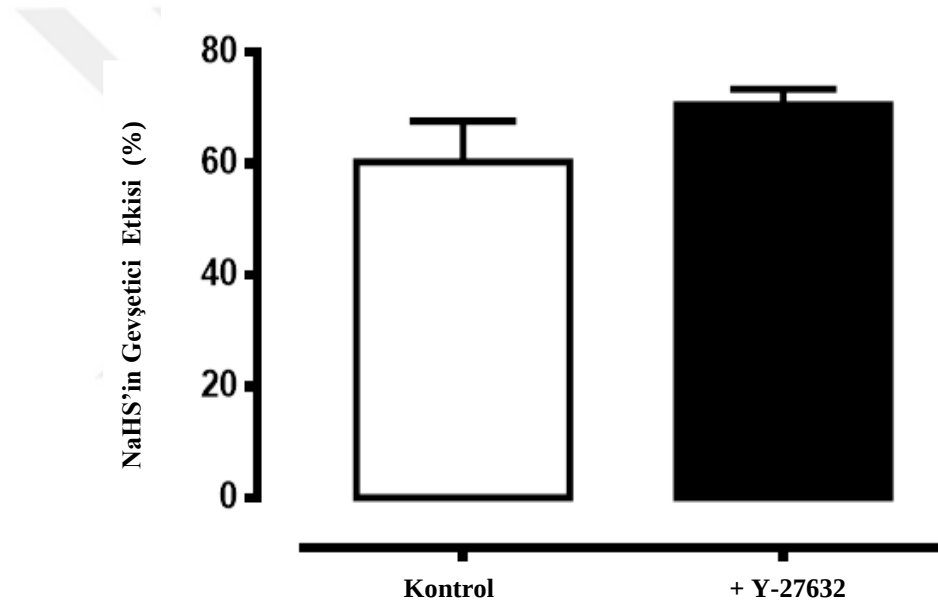
NaHS 'in sığır retinal arterini gevşetici etkisinde PKC yolağının rolü PKC inhibitörü Calphostin-C (10^{-6} M, 20 dk) varlığında incelenmiştir. Retinal arterin Calphostin-C ile inkübasyonu $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontraksiyon sonrasında uygulanan NaHS (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'in maksimum gevşeme yanıtlarında ve pEC_{50} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa sebep olmamıştır (+Calphostin-C; E_{maks} : 44.72 ± 6.88 vs Kontrol E_{maks} : 53.72 ± 5.32 $n=8$ $p>0.05$; +Calphostin-C pEC_{50} : 2.40 ± 0.05 vs Kontrol pEC_{50} : 2.49 ± 0.07 ; $n=8$, $p>0.05$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: PKC inhibitörü Calphostin-C inkübasyonunun (10^{-6} M, 20 dk), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile kastırılan retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - 3×10^{-3} M) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi, $n = 8$; $p > 0.05$.

4.2.3. Rho Kinaz Yolağının Rolünün İncelenmesi

NaHS 'in sığır retinal arterlerini gevşetici etkisinde Rho kinaz yolağının rolü Rho kinaz inhibitörü Y-27632 (10^{-6} M, 20 dk) varlığında incelenmiştir. Retinal arterin Y-27632 ile inkübasyonu $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontraksiyon sonrasında uygulanan NaHS (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'in maksimum gevşeme yanıtlarında ve pEC_{50} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır (+Y-27632; E_{maks} : 70.56 ± 2.86 , vs Kontrol E_{maks} : 60.36 ± 7.29 $n=7$ $p>0.05$; +Y-27632 pEC_{50} : 4.07 ± 0.10 vs Kontrol pEC_{50} : 3.93 ± 0.12 ; $n=7$ $p>0.05$), (Şekil 4-7).

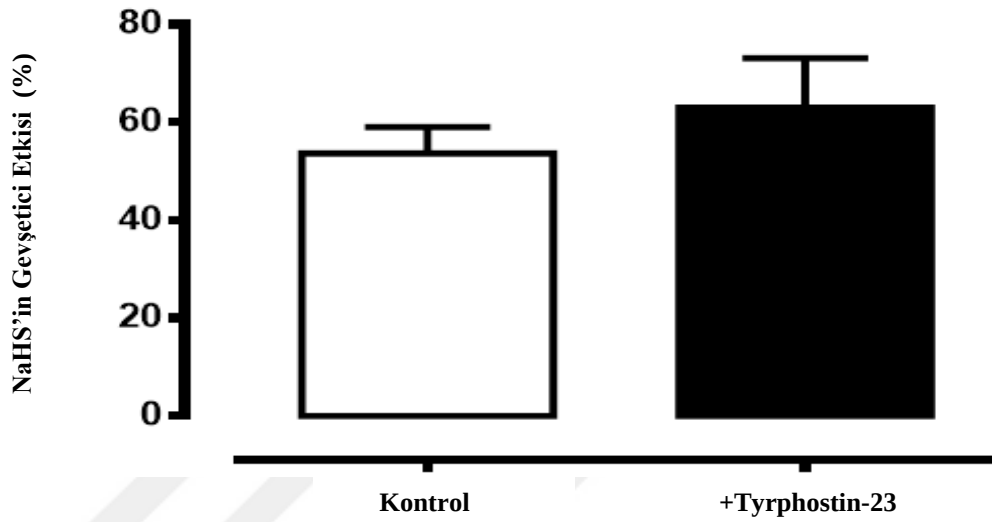


Şekil 4-7: Rho kinaz inhibitörü Y-27632 ile inkübasyonun (10^{-6} M, 20 dk), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3×10^{-5} M) ile kastırılan retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - 3×10^{-3} M) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi, $n = 7$; $p > 0.05$.

4.2.4. Tirozin Kinaz Yolağının Rolünün İncelenmesi

NaHS'in sığır retinal arterini gevşetici etkisinde tirozin kinaz yolağının rolü, tirozin kinaz inhibitörü Tyrphostin-23 (10^{-4} M, 20dk) varlığında incelenmiştir. Retinal arterin Tyrphostin-23 ile inkübasyonu $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile prekontraksiyon sonrasında uygulanan NaHS (10^{-5} - 3×10^{-3} M)'in maksimum gevşeme yanıtlarında ve pEC_{50} değerlerinde

istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (+Tyrphostin-23; E_{maks} : $\%63.01 \pm 10.23$ vs Kontrol, E_{maks} : $\%51.68 \pm 8.99$ $n=8$ $p>0.05$; +Tyrphostin-23 pEC_{50} : 3.01 ± 0.11 vs Kontrol pEC_{50} : 2.72 ± 0.10 ; $n=8$ $p>0.05$) (Şekil 4-8).

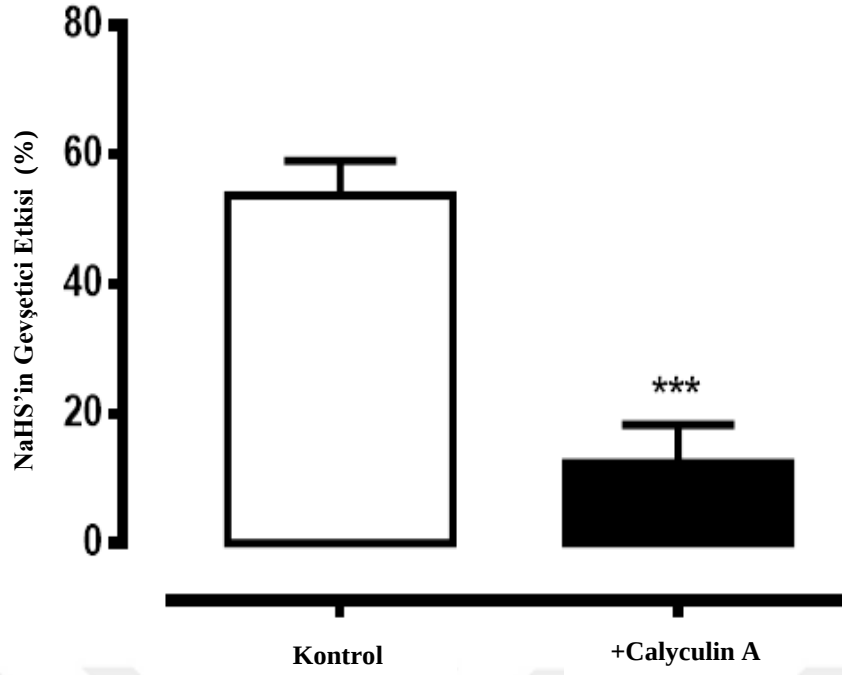


Şekil 4-8: Tirozin kinaz inhibitörü Tyrphostin 23 ile inkübasyonun ($10^{-4}M$, 20 dk), PGF_{2a} ($3 \times 10^{-5}M$) ile kastırılan retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}M$) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi, $n = 8$; $p > 0.05$.

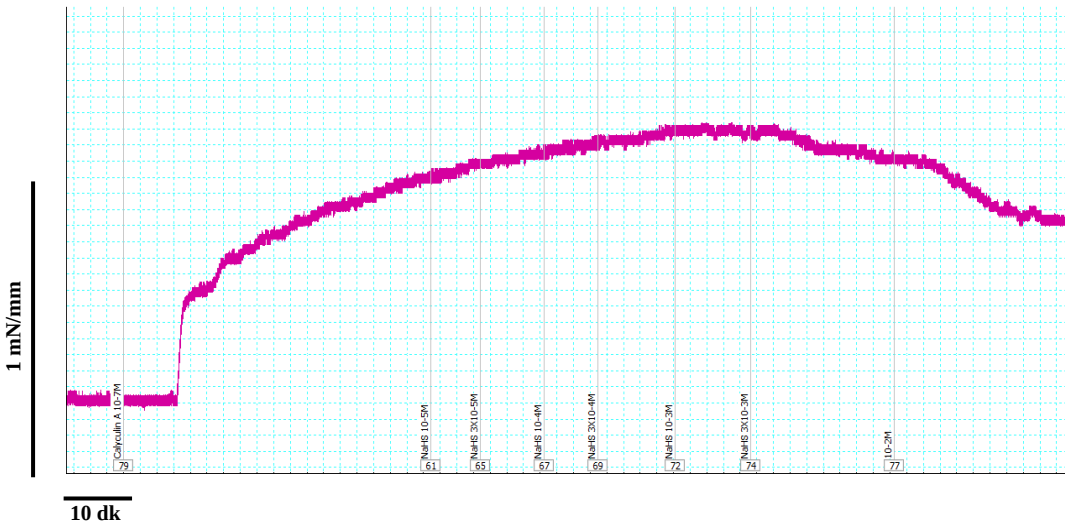
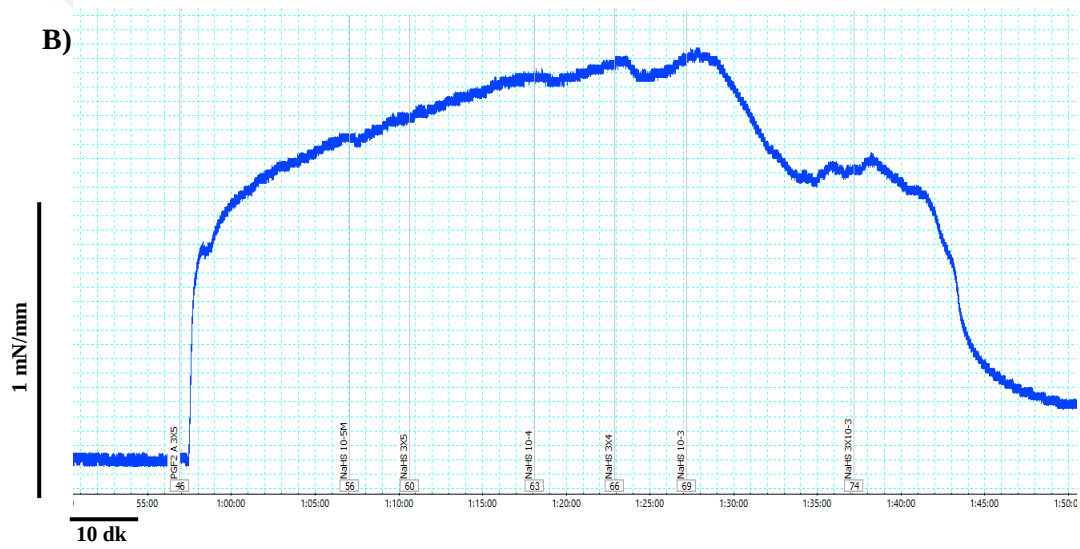
4.2.5. Myozin Fosfataz Yolağının Rolünün İncelenmesi

NaHS'in sıgır retinal arterini gevşetici etkisinde MP yolağının rolü, MP inhibitörü Calyculin-A ($10^{-7}M$, 20 dk) varlığında incelenmiştir. Retinal arterin Calyculin-A ile inkübasyonu NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}M$)'in maksimum gevşeme yanıtında ve pEC_{50} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (+Calyculin-A; E_{maks} : $\%12.45 \pm 5.92$ vs Kontrol E_{maks} : $\%52.34 \pm 5.32$ $n=7$, $p<0.0001$) (Şekil 4-9). Calyculin-A ile inkübe edilen retinal arterlerde PGF_{2a} ilave bir kasılma yanıtına neden olmamış, arterin kasılması Calyculin-A ile sağlanmıştır.

A)



B)



Şekil 4-9: A) MP inhibitörü Calyculin A ile inkübasyonun (10^{-7}M , 20 dk), retinal arterlerde NaHS (10^{-5} - $3 \times 10^{-3}\text{M}$) ile elde edilen maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi, B) Calyculin A'nın NaHS'in gevşeme yanıtları üzerindeki etkisini gösteren orijinal trase, $n = 7$; $p < 0.0001$ kontrole kıyasla.

4.3. Kalsiyum Duyarlılaşmasına Aracılık Eden Hücresel Yolaklara Ait Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile İncelenmesi

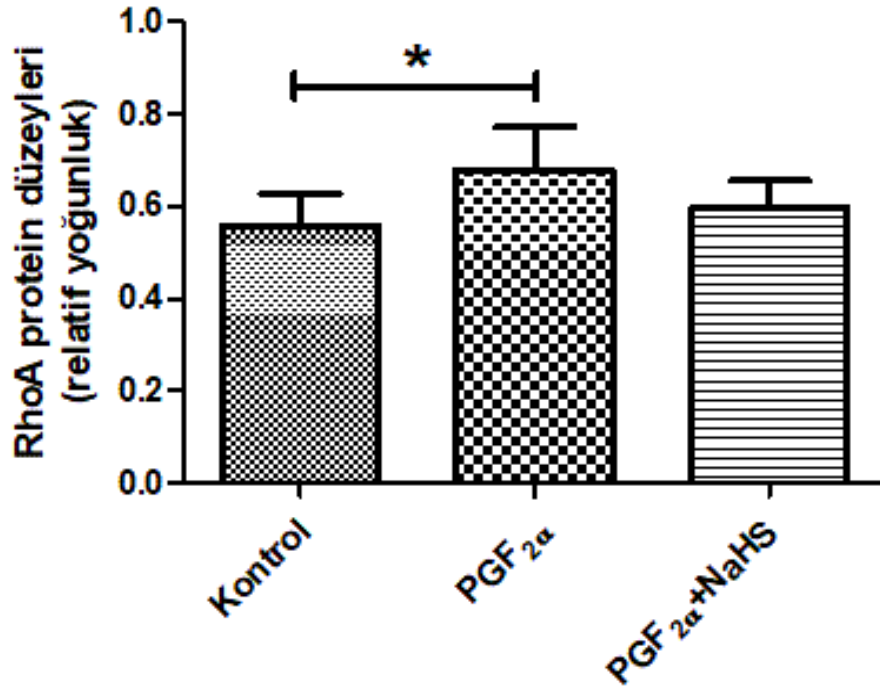
NaHS'in sığır retinal arterleri üzerindeki gevşetici etkisinde RhoA/Rho kinaz, MP ve CPI-17 yolaklarının rolü moleküler düzeyde sırasıyla, Rho A ve Rho kinaz, MP'nin fosforile subünitesi p-MYPT ve CPI-17'in fosforile formu olan p-CPI-17 protein düzeyleri üzerinden incelenmiştir. Bu proteinlerin tayini Kontrol (hiçbir inkübasyon uygulanmamış), PGF_{2α} (10⁻⁴M, 20 dk inkübasyon uygulanmış) ve PGF_{2α}+NaHS' den (10⁻⁴M, 20 dk + 10⁻³M, 20 dk inkübasyon uygulanmış) oluşan üç deney grubunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilecek verilerden kalsiyum duyarlılaşması ile ilişkili yolaklara ait proteinlerin retinal arterde eksprese olup olmadığının, bu proteinlerin ekspresyon düzeylerinin PGF_{2α} ile indüklenen kasılmaya bağlı olarak değişip değişmediğinin ve NaHS 'in retinal arteri gevşetici etkisinde söz konusu kalsiyum duyarlılaşması ile ilgili yolakların rolünün ortaya konulması hedeflenmiştir.

Damar düz kasının kastırıcı bir agonist ile stimülasyonu sonrasında RhoA/Rho kinaz ve/veya CPI-17 yolakları aktifleşebilir ve buna bağlı olarak MP inaktive edilerek Ca²⁺ duyarlılaşması gerçekleşebilir. Retinal arterde Ca²⁺ duyarlılaşmasına aracılık eden RhoA/Rho kinaz, CPI-17 ve/veya MP ile ilgili yolaklarının rolünün olması durumunda, PGF_{2α} grubunda bu duyarlılaşma yolaklarına ilişkin proteinlerin ekspresyon düzeylerinin artması, NaHS'in gevşetici etkisinde bu mekanizmaların rolünün olması durumunda ise; PGF_{2α}+NaHS grubunda bu proteinlerin ekspresyon düzeylerinin azalması söz konusu olacaktır.

4.3.1. RhoA Protein Düzeyleri

PGF_{2α} ile inkübe edilen sığır retinal arterlerinde RhoA protein düzeyleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Ancak, PGF_{2α} grubunda belirlenen RhoA protein düzeyleri PGF_{2α}+NaHS ile inkübe edilen retinal arterlerin RhoA protein düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Benzer şekilde, kontrol grubu ve PGF_{2α}+NaHS grubu birbiri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (+PGF_{2α}: 0,68±0,09 vs Kontrol: 0,56±0,07 n=3 p<0.05; +PGF_{2α}: 0,68±0,09 vs +PGF_{2α}+NaHS: 0,60±0,06 p>0.05; +PGF_{2α}+NaHS: 0,60±0,06 vs Kontrol: 0,56±0,07 p>0.05), (Şekil 4-10). Sonuçlarımız RhoA proteininin

retinal arterde eksprese olduğunu, RhoA'nın retinal arterde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile indüklenen kasılmaya kısmen aracılık ettiği ve dolayısıyla düz kas kontraktıl proteinlerin Ca^{2+} duyarlılaşmasına kısmen katkı sağlayabileceğini, ancak NaHS 'in retinal arteri gevşetici etkisinin RhoA proteini ve RhoA ile kenetli kalsiyum duyarlılaşması ile ilişkili olmadığını göstermektedir.

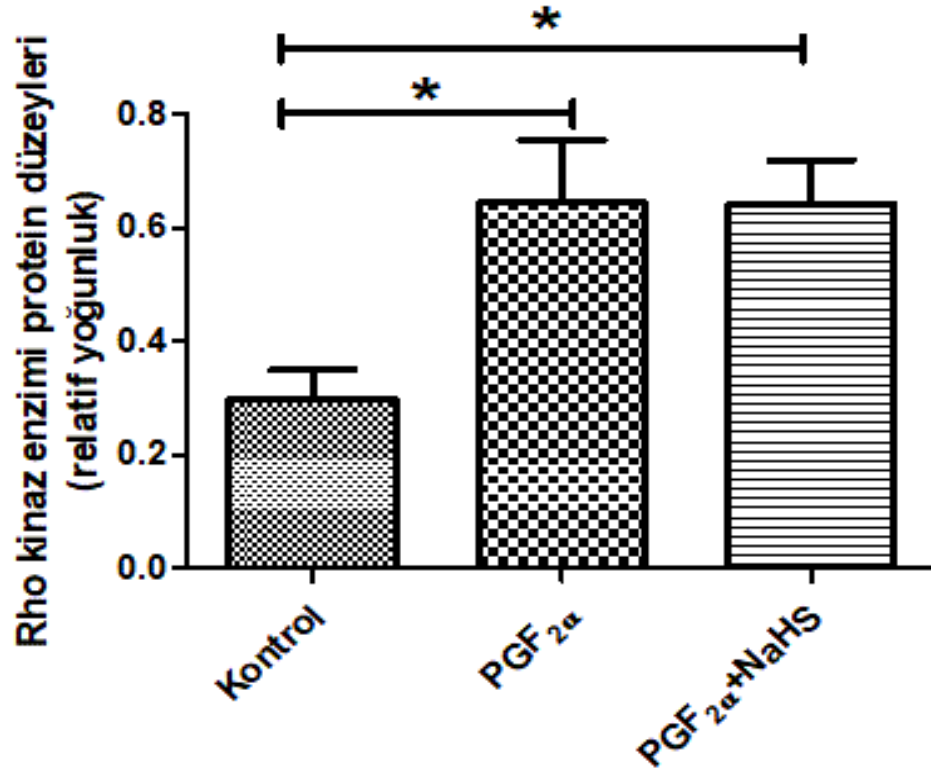


Şekil 4-10: Sığır retinal arterinde RhoA protein düzeylerinin kontrol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ and $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{NaHS}$ gruplarında relatif yoğunluk hesaplaması ile gösterimi $n = 3$, $p < 0.05$

4.3.2. Rho Kinaz Protein Düzeyleri

Rho kinaz enzim düzeyleri $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{NaHS}$ gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Ancak, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{NaHS}$ gruplarının Rho Kinaz düzeyleri birbiri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($+\text{PGF}_{2\alpha}$: $0,64 \pm 0,11$ vs kontrol: $0,30 \pm 0,05$ $n=3$ $p < 0.05$; $+\text{PGF}_{2\alpha}$: $0,64 \pm 0,11$ vs $+\text{PGF}_{2\alpha} + \text{NaHS}$: $0,64 \pm 0,08$ $p > 0.05$; $+\text{PGF}_{2\alpha} + \text{NaHS}$: $0,64 \pm 0,08$ vs kontrol: $0,30 \pm 0,05$ $p < 0.05$), (Şekil 4-11). Sonuçlarımız Rho kinaz enziminin retinal arterde eksprese olduğunu, Rho kinaz yolağının retinal arterde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile indüklenen kasılmaya önemli düzeyde aracılık ettiği ve dolayısıyla düz kas kontraktıl proteinlerinin

Ca^{2+} duyarlılaşmasına önemli katkı sağlayabileceğini, ancak NaHS'in retinal arteri gevşetici etkisinin Rho kinazın inhibisyonu üzerinden gerçekleşmediğini göstermektedir.

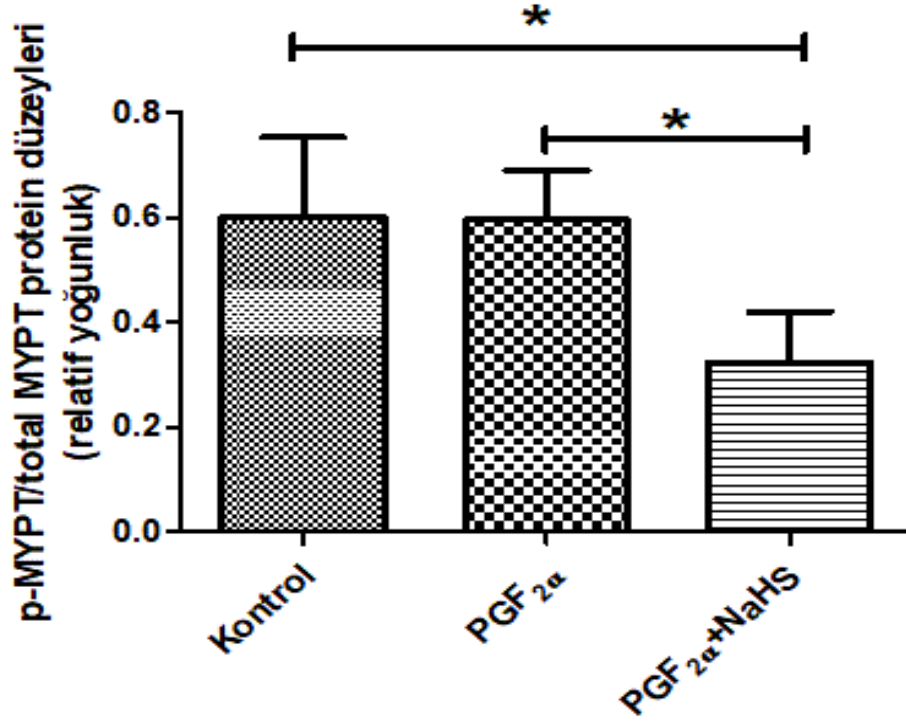


Şekil 4-11: Rho kinaz enziminin protein düzeylerinin kontrol, PGF_{2α} ve PGF_{2α}+NaHS gruplarında relatif yoğunluk hesaplaması ile gösterimi, n = 3, p<0.05

4.3.3. p-MYPT/total MYPT Protein Düzeylerinin İncelenmesi

MP'nin bir alt ünitesi olan MYPT1'in fosforilasyonu (p-MYPT) MP'nin inaktive olmasına ve düz kasın kasılmasına aracılık eder. Çalışmamızda sığır retinal arterinde, Kontrol, PGF_{2α} ve PGF_{2α} + NaHS gruplarında p-MYPT/total MYPT protein düzeyleri kıyaslandığında; PGF_{2α}+NaHS grubuna ait p-MYPT/total MYPT protein düzeyleri, hem kontrole hem de PGF_{2α} grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (PGF_{2α}+NaHS: 0,32±0,10 vs +PGF_{2α}: 0,60±0,09 n=3 p<0.05; PGF_{2α}+NaHS: 0,32±0,10 vs kontrol: 0,60±0,15 p<0.05). Ancak PGF_{2α} grubu kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (+PGF_{2α}: 0,60±0,09 vs. kontrol:

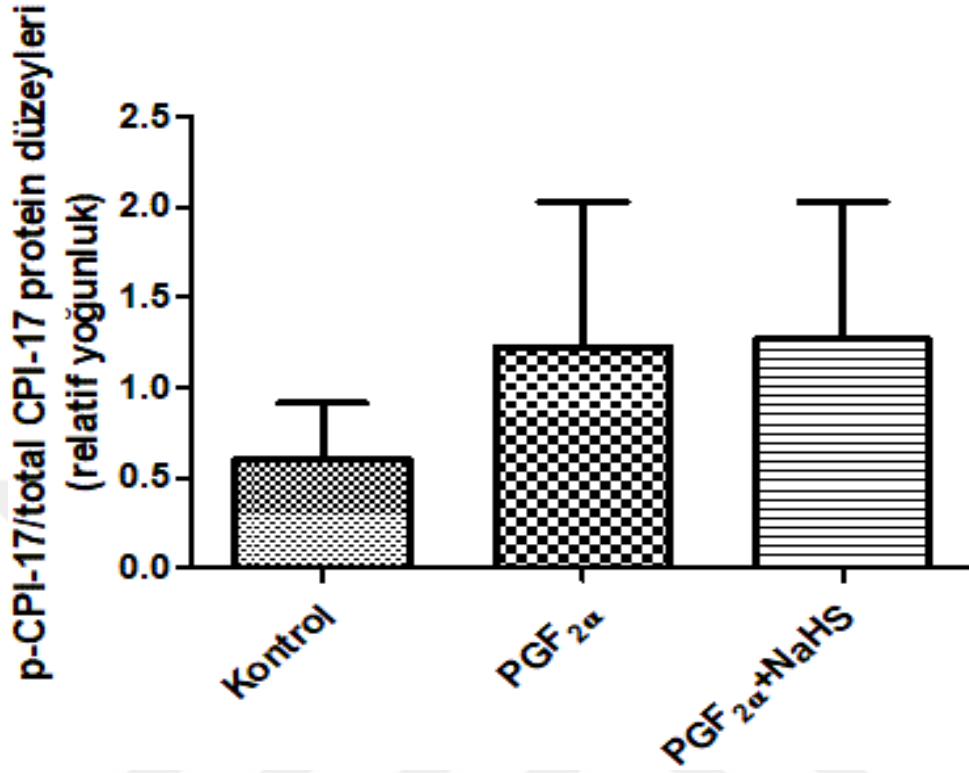
0,60±0,15 $p>0.05$), (Şekil 4-12). Elde edilen sonuçlar, $\text{PGF}_{2\alpha}$ varlığında MYPT1 fosforilasyonun değişmediğini, fosforile MYPT1'in hem istirahat hem de kasılma durumunda benzer olduğunu, bununla birlikte NaHS'in retinal arteri gevşetici etkisinde MYPT1 fosforilasyonunun azaltılmasının önemli bir rolü olduğunu göster



Şekil 4-12: p-MYPT/total MYPT protein düzeylerinin kontrol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve $\text{PGF}_{2\alpha}+\text{NaHS}$ gruplarında relatif yoğunluk hesaplaması ile gösterimi $n = 3$, $p<0.05$

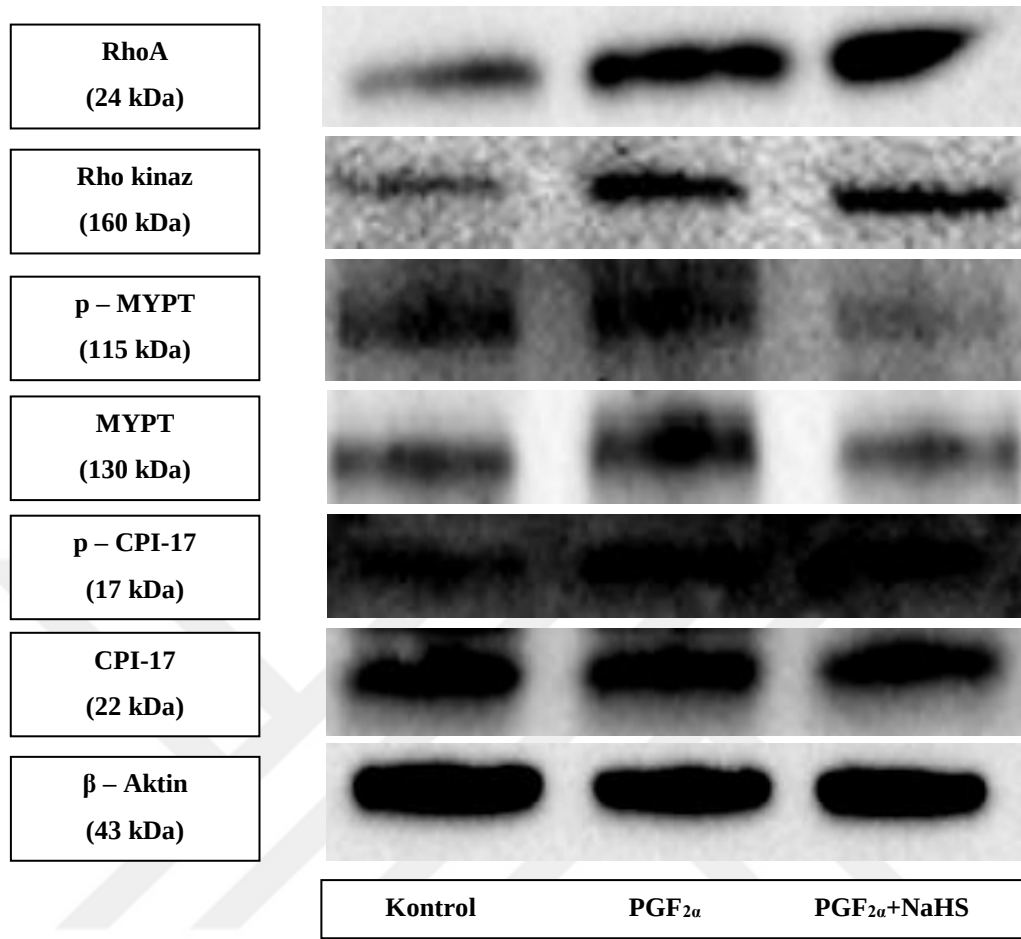
4.3.4. p- CPI-17/ total CPI-17 Protein Düzeylerinin İncelenmesi

$\text{PGF}_{2\alpha}$ veya $\text{PGF}_{2\alpha}+\text{NaHS}$ ile inkübe edilen sığır retinal arter gruplarında p-CPI-17/total CPI-17 protein düzeylerindeki artış kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (+ $\text{PGF}_{2\alpha}$: $1,23\pm0,81$; + $\text{PGF}_{2\alpha}+\text{NaHS}$: $1,27\pm0,76$ vs kontrol: $0,61\pm0,31$ $n=3$ $p>0.05$), (Şekil 4-13). Elde edilen bulgular, Ca^{2+} duyarlılaşmasına aracılık eden bir diğer yolak olan CPI-17'nin retinal arterde eksprese olduğunu, ancak $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile indüklenen kasılmaya anlamlı düzeyde aracılık etmediğini, dolayısıyla bu yolağın retinal arterde kontraktıl proteinlerin Ca^{2+} duyarlılaşmasında rolü olmadığını ve ayrıca NaHS'in retinal arteri gevşetici etkisinin CPI-17 yolağının inhibisyonu üzerinden gerçekleşmediğini göstermektedir.



Şekil 4-13: p-CPI-17/total CPI-17 protein düzeylerinin kontrol, PGF_{2α} ve PGF_{2α}+NaHS gruplarında relatif yoğunluk hesaplaması ile gösterimi n = 3, p>0.05

Kalsiyum duyarlılaşması ile ilgili olarak NaHS'in retinal arterdeki gevşetici etkisinde rolü incelenen tüm proteinlerin kontrol, PGF_{2α} ve PGF_{2α}+NaHS gruplarında Western Blot analizi ile elde edilen bantları Şekil 4-14'de gösterilmiştir.



Şekil 4-14: Western blot analizinde, retinal arterin protein ekstraktlarından elde edilen RhoA, Rho kinaz, p-MYPT, total MYPT, p-CPI-17, total CPI-17 ve internal kontrol β-aktin proteinlerinin kontrol, PGF_{2α} ve PGF_{2α}+NaHS gruplarında gözlenen bantları

4.4. H₂S'in Biyosentezinde Rol Alan Enzimlerin Retina ve Retinal Arterdeki Düzeylerinin ELISA ile Değerlendirilmesi

H₂S'in sentezlenmesine aracılık ettiği bilinen 3-MST, CBS ve CSE enzimlerinin rolü sıgır retinası ve retinal arterindeki düzeyleri ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir.

4.4.1. 3-MST Enzim Düzeyleri

Retina ve retinal arterde 3-MST enzimi düzeyleri retinada: 3,55±1,12 pg/mg doku (n=8), retinal arterde: 9,85±3,24 pg/mg doku (n=30) olarak ölçülmüştür (Şekil 4-15).

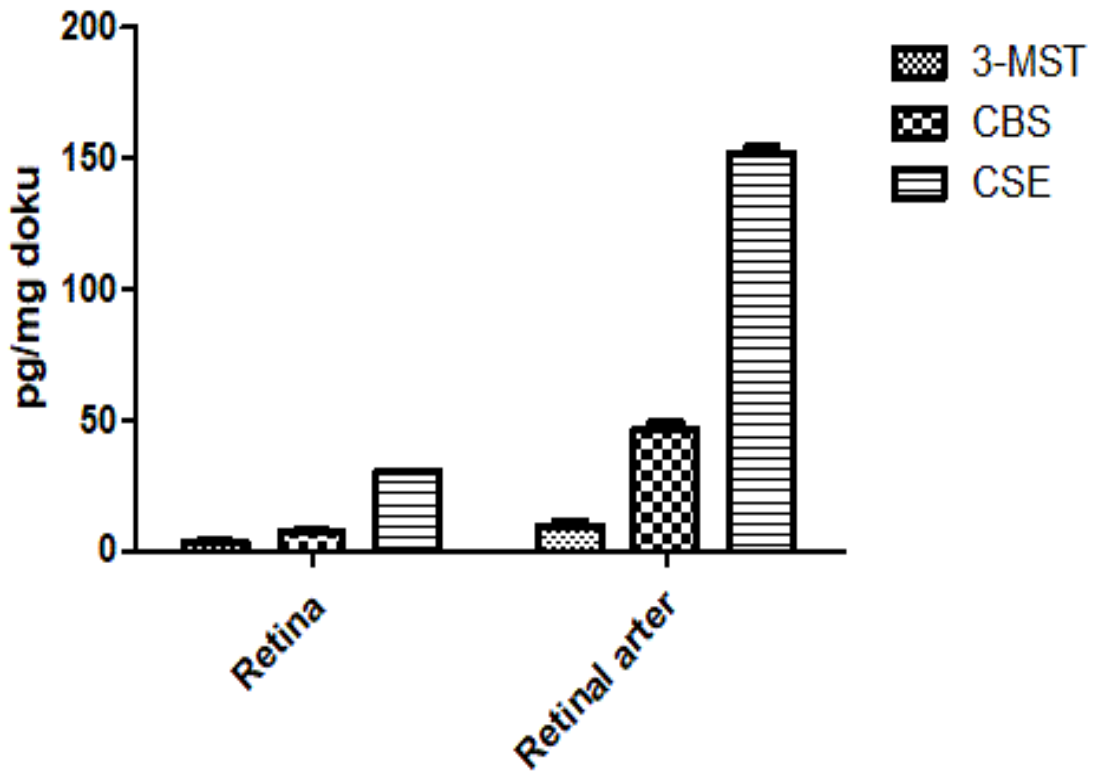
4.4.2. CBS Enzim Düzeyleri

CBS enziminin düzeyleri retinada: $7,84 \pm 0,87$ pg/mg doku (n=30), retinal arterde: $46,35 \pm 4,69$ pg/mg doku (n=45) olarak ölçülmüştür (Şekil 4-15).

4.4.3. CSE Enzim Düzeyleri

CSE enziminin düzeyleri retinada: $30,34 \pm 1,08$ pg/mg doku (n=30), retinal arterde: $152,17 \pm 4,15$ pg/mg doku (n=45) olarak ölçülmüştür (Şekil 4-15).

ELISA deneylerinden elde edilen bu sonuçlar hem retinada hem de retinal arterde H_2S sentezine aracılık eden her üç enzimin de bulunduğu ve enzim düzeylerinin retinal arterde retina dokusuna göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hem retinada hem de retinal arterde bu enzimlerden 3-MST düzeylerinin diğerlerine göre daha düşük olduğu, CBS düzeylerinin ise diğerlerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



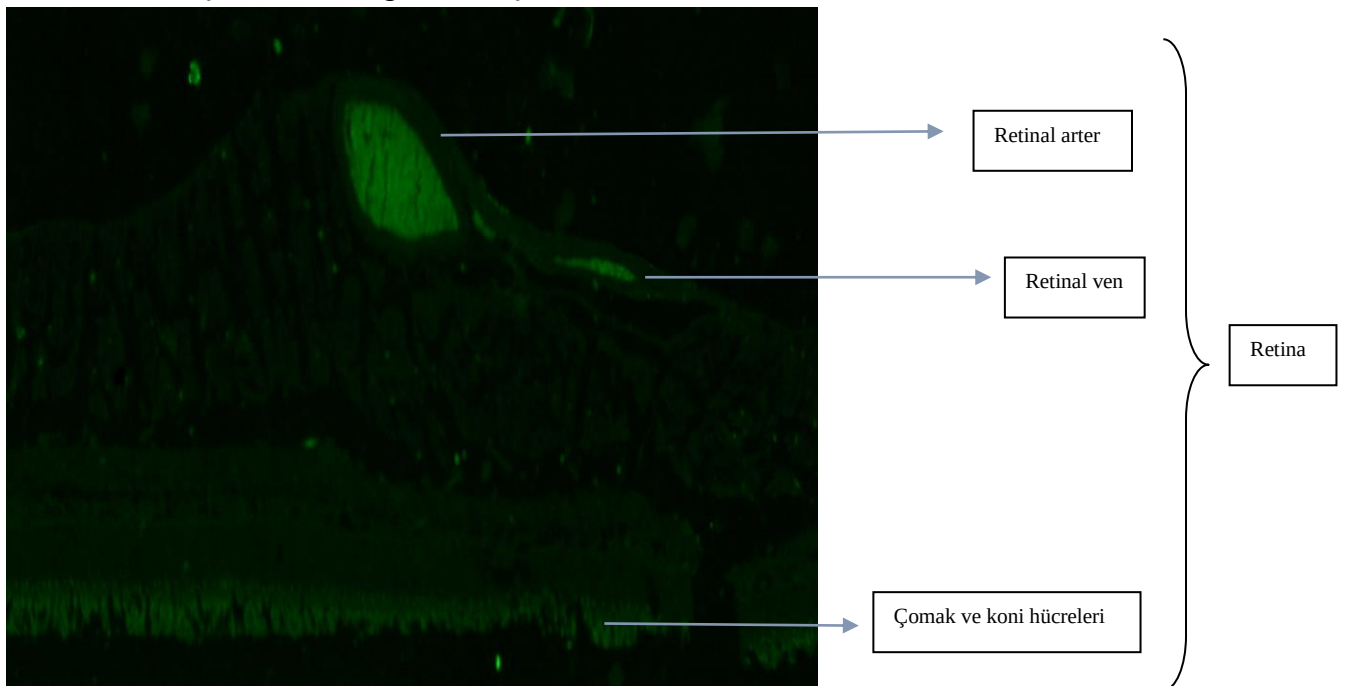
Şekil 4-15: Retina ve retinal arterde 3-MST, CBS ve CSE enzimlerinin ELISA ile ölçülen düzeyleri (pg/mg doku)

4.5. Retina ve Retinal Arterde CBS ve CSE Enzimlerinin Dağılımının İmmüno Floresans Mikroskopik Analiz ile Değerlendirilmesi

H₂S'in sentezlenmesinden sorumlu olan CBS ve CSE enzimlerinin retinada ve retinal arterdeki varlığını ve düzeylerini ortaya koyan ELISA bulgularını desteklemek üzere, bu enzimlerin retina tabakaları ve retinal arterdeki dağılımları immüno floresans mikroskopik analizler ile değerlendirilmiştir. 3- MST enziminin ELISA sonuçlarımıza göre retina ve retinal arterde düşük miktarlarda bulunması ve ayrıca, immüno floresans için sığır'a özgü 3-MST antikorunun olmaması nedeniyle, 3-MST için immüno floresans görüntüleme yapılmamıştır. Enzimlerin yaptığı ışımalar epifloresans mikroskoba bağlı olan kamera ile görüntülenip kaydedilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız 3 farklı değişken ile elde edilmiştir.

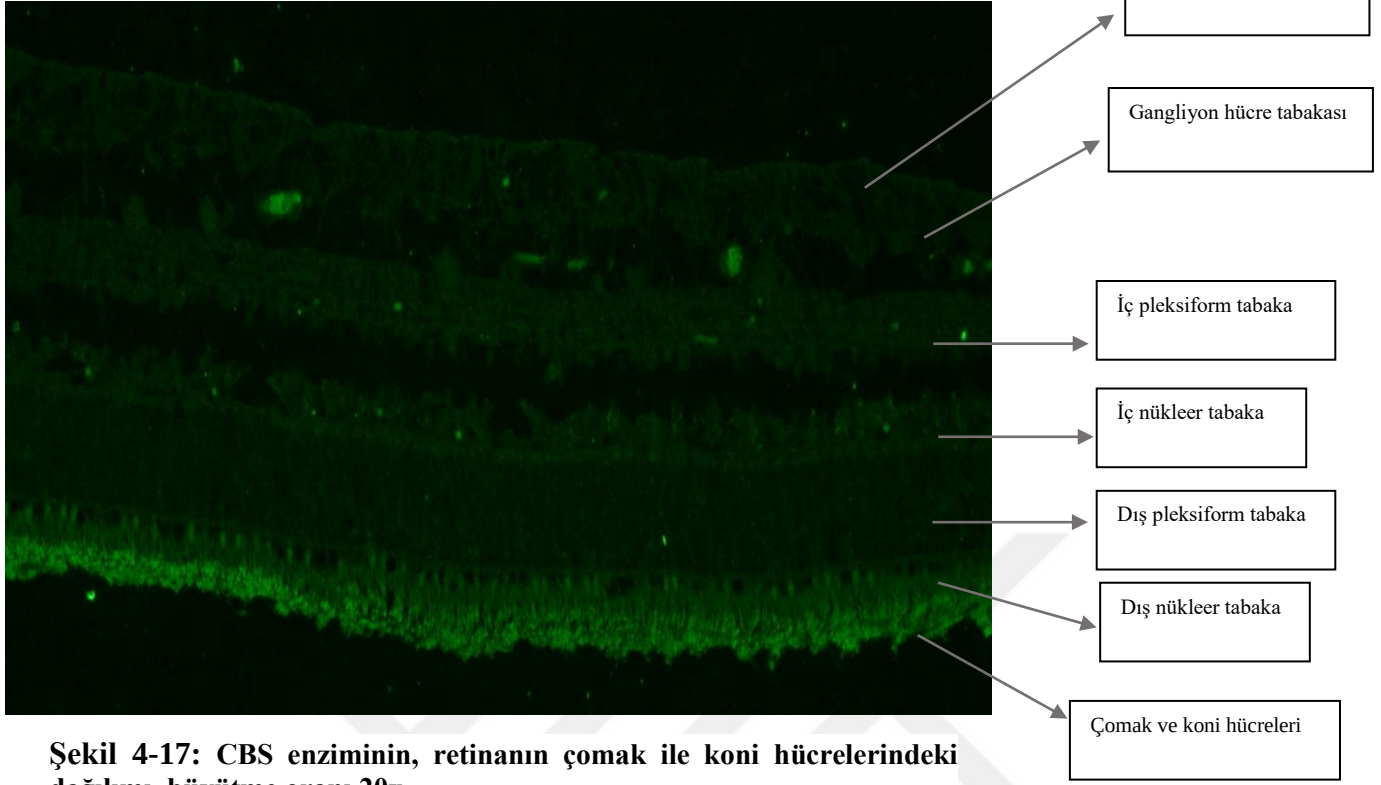
4.5.1. CBS Enziminin Dağılımı

CBS enziminin, retina ve retinal arterde CSE enzime göre daha az eksprese olduğu izlenmiştir. CBS enzimi retinada özellikle koni ve çomak hücreleri ile ganglion hücre tabakasında; retinal arterde ise damar düz kas hücrelerinde yoğunlaşmıştır. Ayrıca, retinal arterin endotel tabakasında da kısmi olarak bulunduğu belirlenmiştir. Retina ve/veya retinal arterdeki CBS enzimi dağılımları Şekil 4-16; Şekil 4-17, Şekil 4-18 ve Şekil 4-19'da gösterilmiştir.

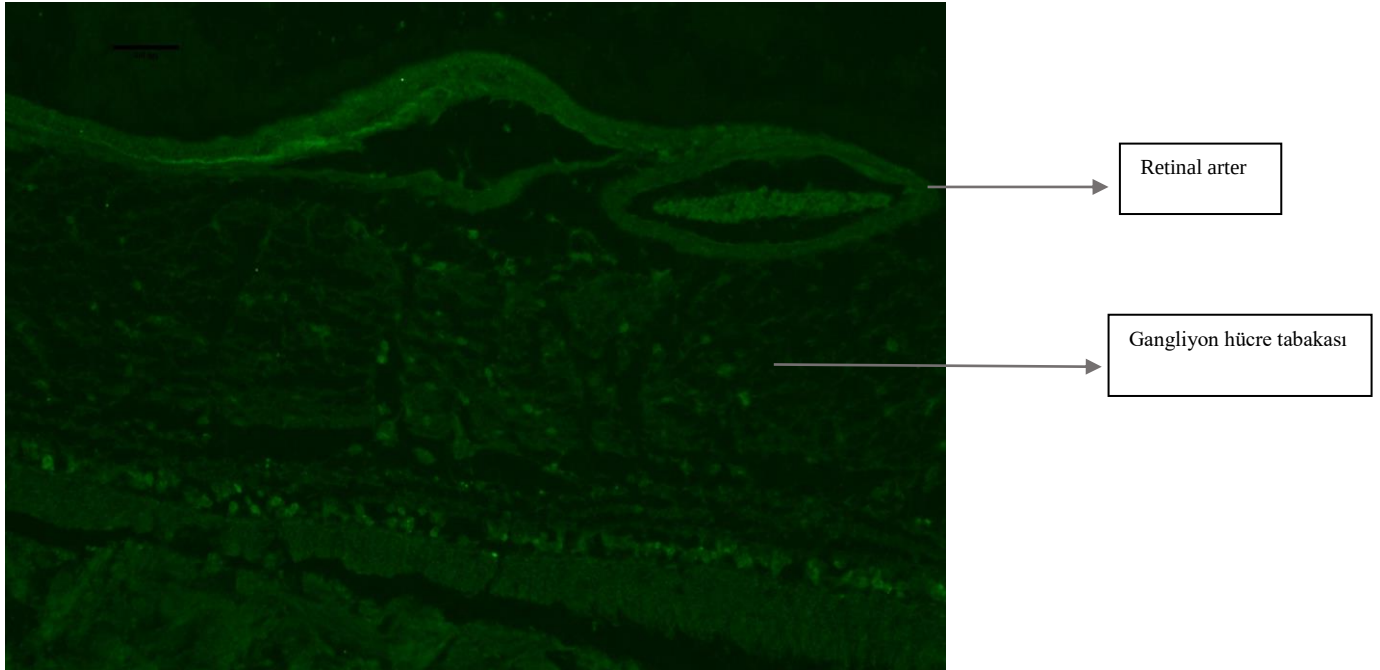


Şekil 4-16: CBS enziminin retinanın çomak ile koni hücrelerindeki ve retinal arterdeki dağılımı. büyütme oranı 10x

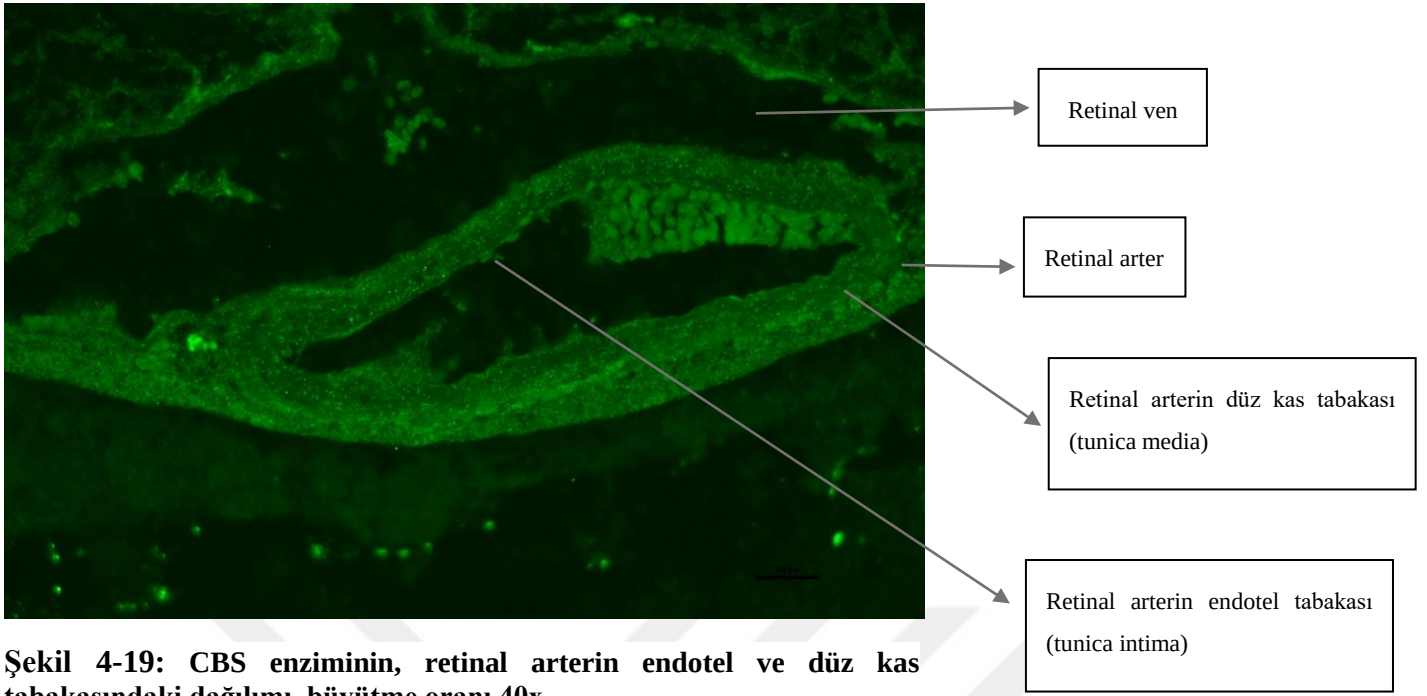
Retina



Şekil 4-17: CBS enziminin, retinanın çomak ile koni hücrelerindeki dağılımı, büyütme oranı 20x



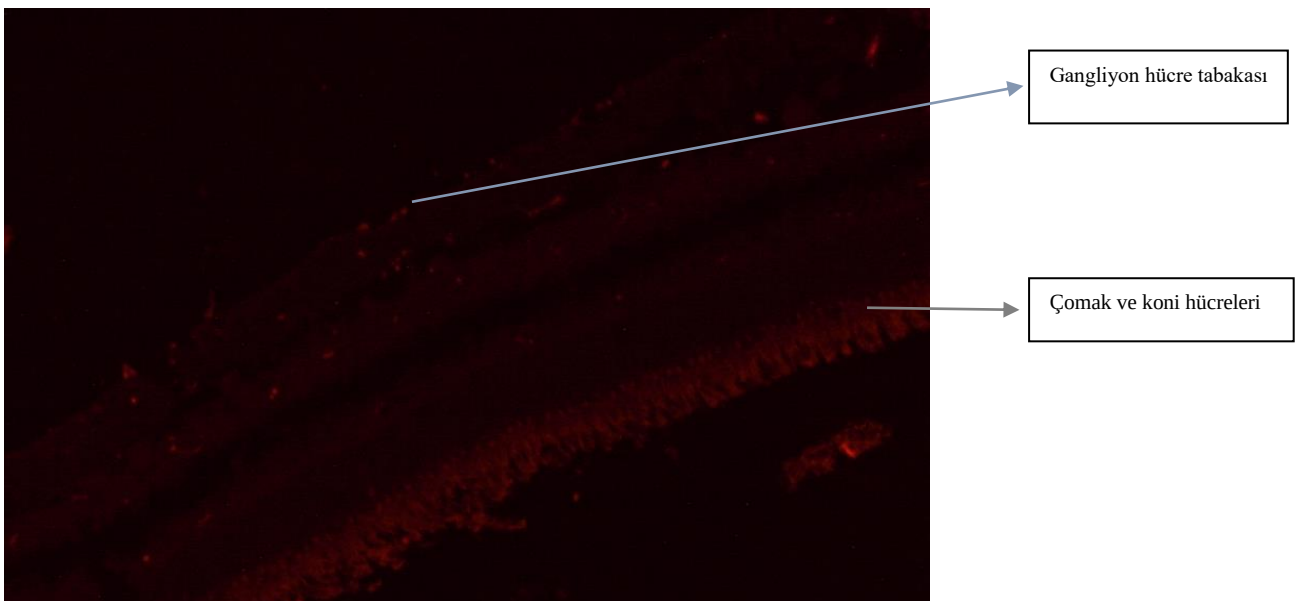
Şekil 4-18: CBS enziminin, retinal arterin düz kas tabakasındaki ve retinanın gangliyon hücre tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 20x



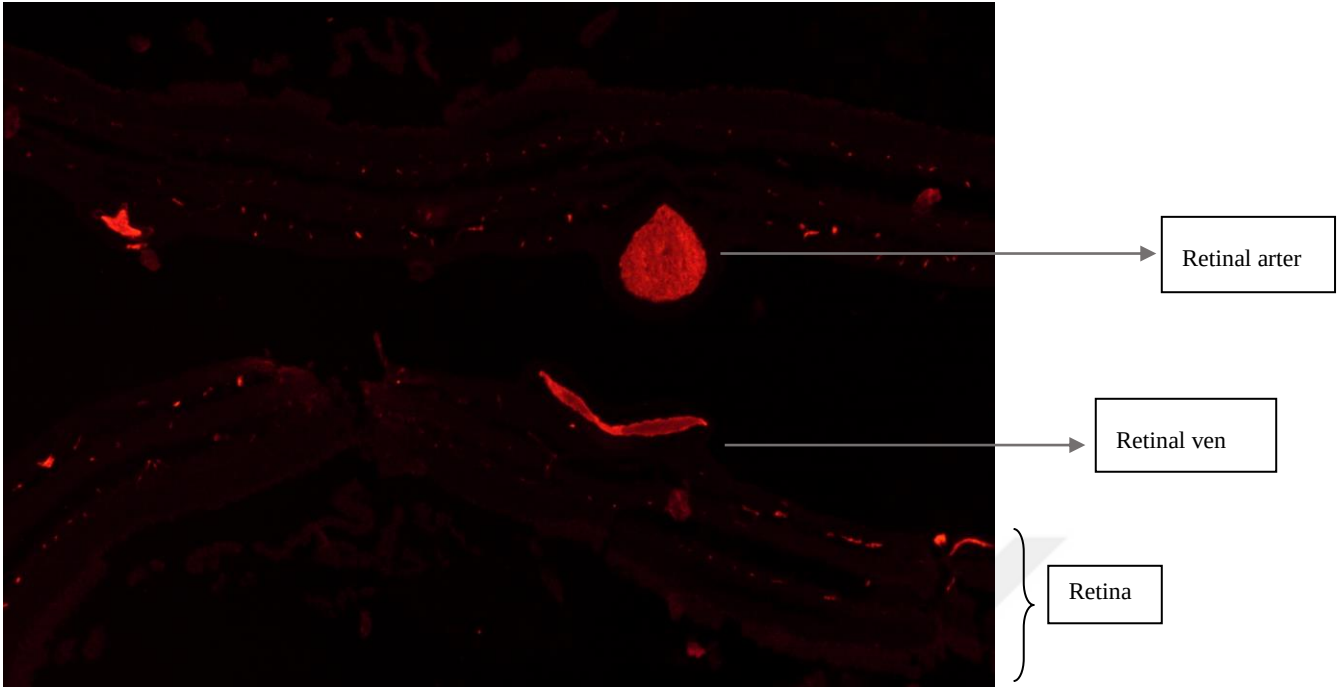
Şekil 4-19: CBS enziminin, retinal arterin endotel ve düz kas tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 40x

4.5.2. CSE Enziminin Dağılımı

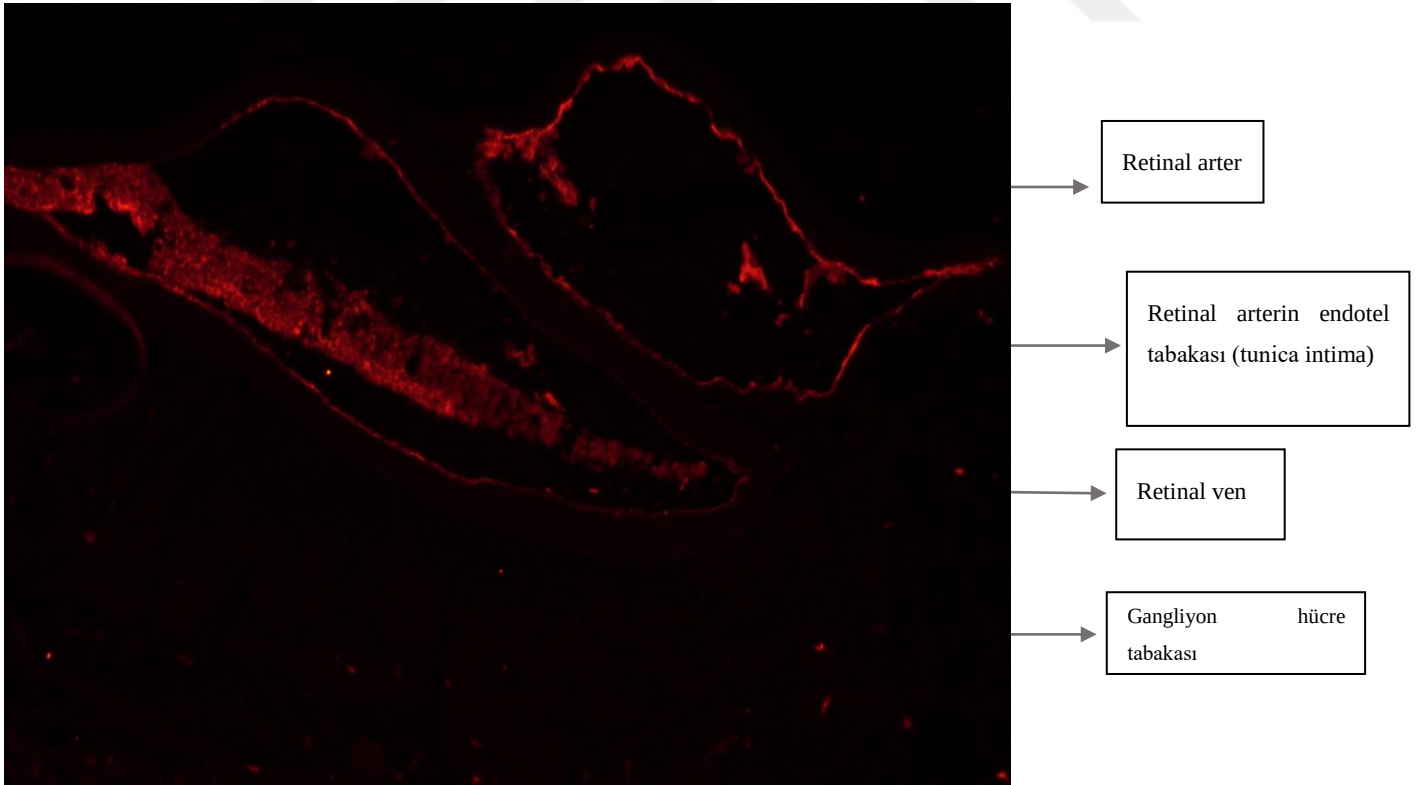
CSE enzimi, retina ve retinal arterde CBS enzimine göre daha fazla eksprese olup, retinada koni ve çomak hücrelerinde, gangliyon hücrelerinde ve bipolar hücrelerde, retinal arterde ise özellikle endotel hücrelerinde yoğunlaşmıştır. Retina ve retinal rterdeki CSE enzimi dağılımları Şekil 4-20, Şekil 4-21, Şekil 4-22, Şekil 4-23 ve Şekil -24'de gösterilmiştir.



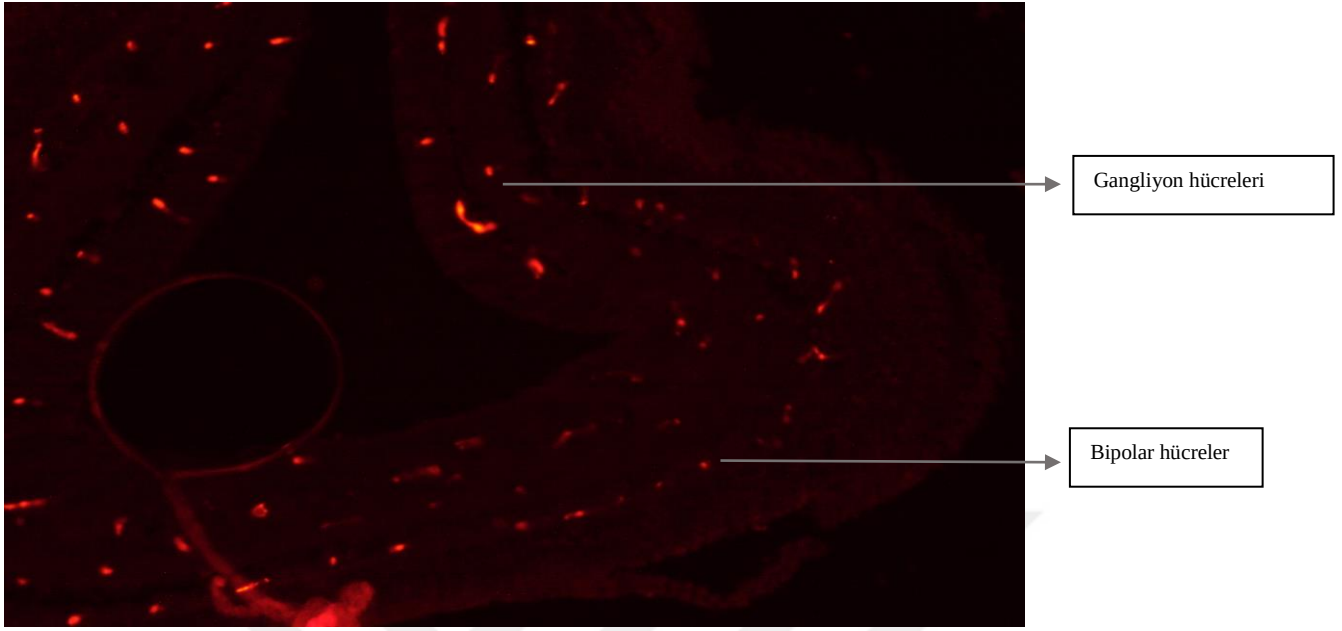
Şekil 4-20: CSE enziminin, retinanın çomak ile koni hücrelerinde ve gangliyon hücre tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 10x



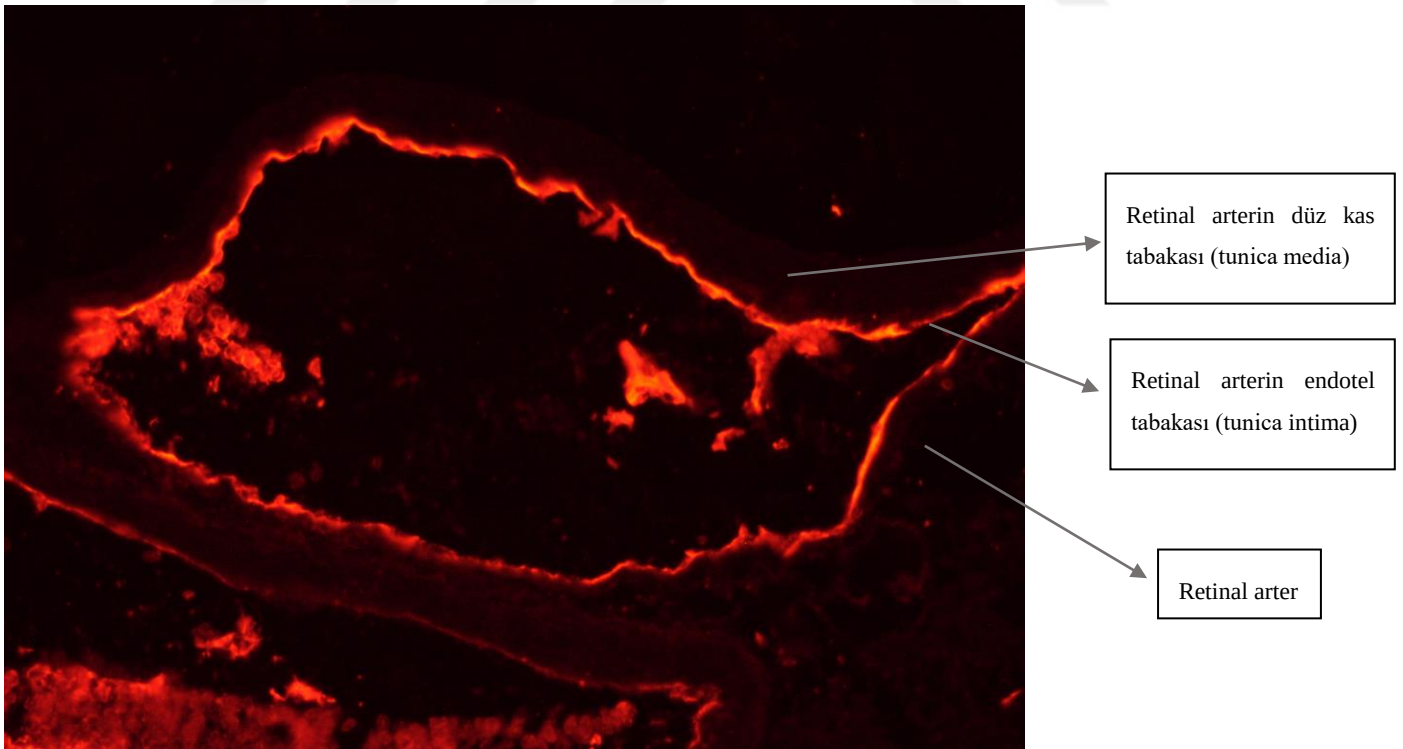
Şekil 4-21: CSE enziminin, retina ve retinal arterdeki dağılımı, büyütme oranı 10x



Şekil 4-22: CSE enziminin, retinal arterin endotel tabakasındaki ve retinanın gangliyon hücre tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 20x



Şekil 4-23: CSE enziminin, retinanın gangliyon ve bipolar hücre tabakalarındaki dağılımı, büyütme oranı 20x



Şekil 4-24: CSE enziminin, retinal arterin endotel tabakasındaki dağılımı, büyütme oranı 40x

5. TARTIŞMA

Vasküler tonüsün regülasyonuna katkı sağlayan çok sayıda mekanizma bulunmaktadır. Bununla birlikte damarda meydana gelen kasılma ve gevşeme yanıtlarının; Ca^{2+} bağımlı ve Ca^{2+} 'dan bağımsız olmak üzere temelde iki farklı mekanizmayla düzenlendiği bilinmektedir. Ca^{2+} bağımlı yolda; çeşitli iyon kanalları, iyon pompaları ve membran depolarizasyonu aracılığıyla hücre içi Ca^{2+} düzeyleri artırılır. Sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunun artışı, damar düz kas hücrelerinde kasılmayı tetikleyen temel etkidir. Bu artış için temel kaynaklar ekstraselüler alandan hücre içine giren ve hücre içi depolardan sağlanan Ca^{2+} 'dur. Buna göre, damar düz kas hücrelerinde kasılma yanıtı indüklendiğinde, hücre dışı alandan hücre içine doğru Ca^{2+} geçişi olur ve/veya hücre içi depolardan sitozole doğru Ca^{2+} çıkışı gerçekleşir (Ottolini ve ark. 2019). Damar düz kasının kasılma kuvveti genellikle hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artışına bağlı olarak artsa da, Ca^{2+} miktarında bir değişiklik olmadan da artış gösterebilir. Bu durum kontraktıl proteinlerin Ca^{2+} 'a duyarlılığının artması (Akata 2007b) veya MLC_{20} 'nin fosforile halde kalmasını sağlayan Ca^{2+} duyarlılaşması ile ilişkilidir (Hirano ve ark. 2004).

H_2S donörü NaHS'in sıgır retinal arteri üzerindeki gevşetici etkisinin kalsiyum sinyal yolları ve kalsiyum duyarlılaşması ile ilişkisini araştırdığımız çalışmamızda, ilk olarak ekstraselüler Ca^{2+} 'un H_2S 'e bağlı gelişen vazodilatasyondaki rolü değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede, $Ca^{2+}(+)$ ve $Ca^{2+}(-)$ ortamda $PGF_{2\alpha}$ ile kastırılan damarlarda kümülatif NaHS uygulaması ile elde edilen gevşeme yanıtlarının birbirine benzer olduğu, dolayısıyla gevşemenin ekstraselüler Ca^{2+} 'a ihtiyaç göstermediği gözlenmiştir. NaHS'in sıgır retinal arteri üzerindeki etkisini incelediğimiz önceki çalışmamızda, L-tipi Ca^{2+} kanallarının blokajının retinal arterde NaHS ile elde edilen gevşeme yanıtlarını etkilemediği belirlenmişti (Takır ve ark. 2015a). Buna göre $Ca^{2+}(-)$ ortamda ya da L-tipi Ca^{2+} kanal blokajı ile hücre dışından hücre içine Ca^{2+} iyonunun girişi engellendiğinde, gevşeme yanıtının kontrole kıyasla değişmemesi; ekstraselüler kalsiyumun NaHS'in retinal arterdeki gevşetici etkisinde önemli bir rolünün olmadığına işaret etmektedir. Bizim verilerimizden farklı olarak, sıçan aortasında yapılan bir çalışmada, H_2S 'in gevşetici etkisine kısmi olarak ekstraselüler kalsiyum girişinin aracılık ettiği bildirilmiştir (Zhao ve Wang 2002). Benzer şekilde, sıçan mezenterik

arterinde NaHS'in gevşetici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, etkiden sorumlu mekanizmaların K^+ kanal aktivasyonu ve Ca^{2+} düzeylerinin azaltılması ile ilişkili olduğu ortaya konmuş ancak Ca^{2+} düzeylerinin azaltılmasının mekanizması araştırılmamıştır (Hedegaard ve ark. 2015).

Ekstraselüler alandan sitozole Ca^{2+} geçişine aracılık eden başlıca iyon kanalları VOCC, ROCC ve SOCC'lardır. Çalışmamızda, $Ca^{2+}(-)$ ortamda, KCl ile depolarize edilen arterlerde $CaCl_2$ 'ün artan konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen kasılma yanıtının; NaHS ile inkübe edilen grupta kontrole kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, $Ca^{2+}(-)$ ortamda KCl ile depolarizasyonu takiben $CaCl_2$ ile kastırılan damarlar üzerine kümülatif olarak NaHS uygulanması gevşeme yanıtının oluşumuna yol açmıştır. Oluşan bu yanıt, $Ca^{2+}(-)$ veya $Ca^{2+}(+)$ ortamda $PGF_{2\alpha}$ ile kastırılan damarlarda elde edilen cevaplar ile benzerdir. $CaCl_2$ 'ün oluşturduğu kasılma yanıtı VOCC'ların aktivasyonuna bağlı olarak, ekstraselüler ortamdan kaynak alan sitozolik Ca^{2+} artışıyla gerçekleşmektedir. NaHS'in $CaCl_2$ ile oluşturulan kasılma yanıtını baskılaması ya da geriye döndürmesi, etkisinin kısmen Ca^{2+} girişinin inhibisyonu ile hücre içi $[Ca^{2+}]$ 'un azaltılmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, önceki çalışmamızda nifedipin ile VOCC blokajının retinal arterde NaHS'e ait gevşeme yanıtlarını değiştirmemiş olması (Takır ve ark. 2015a). NaHS'in $CaCl_2$ kasılmalarında oluşturduğu inhibitör etkinin direkt olarak VOCC'ların inhibisyonu ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, NaHS'in bu etkisi L-tipi Ca^{2+} kanalı dışındaki bir iyon kanalından (nonselektif katyon kanalı ya da SOCC gibi) hücre içine Ca^{2+} girişinin engellenmiş olması ile ilişkili olabilir (Karaki ve ark. 1997; Gibson ve ark. 1998). Öte yandan, NaHS varlığında $CaCl_2$ ile indüklenen kasılmaların belirgin olarak azalması, bu inhibisyonun damar düz kasında kontraktıl myofilamentlerin Ca^{2+} duyarlılığında bir azalma ile ilişkili olabileceğini de göstermektedir.

NaHS'in retinal arterdeki gevşetici etkisinin incelendiği ilk çalışmamızda vazodilatasyonun mekanizmasının kısmi olarak K_v ve K_{ir} kanallarının aktivasyonu üzerinden gerçekleştiği belirlenmişti (Takır ve ark. 2015a). Depolarizasyon ile aktive olan K_v kanallarının, hücreyi hiperpolarize ederek VOCC'ları inhibe ettiği ve hücre içinde $[Ca^{2+}]$ 'u düşürdüğü bildirilmiştir (Tykocki ve ark. 2017). Buna göre, NaHS'in $CaCl_2$ ile indüklenen kasılmayı inhibe etmesi veya geriye döndürmesi direkt olarak

VOCC'ların inhibisyonu ile ilişkili olmamakla birlikte, K_v kanalları aktivasyonu üzerinden indirekt olarak Ca^{2+} girişinin baskılanmış olması ile de ilgili olabilir.

Hücre içinde $[Ca^{2+}]$ 'un azalmasına aracılık eden bir diğer mekanizma Ca^{2+} 'un SERCA pompası aracılığı ile hücre içi Ca^{2+} deposuna alınmasıdır. Ancak, henüz yayınlanmamış olan bulgularımızda SERCA inhibitörü siklopiyazonik asit varlığında NaHS'in gevşetici etkisinin değişmediği gözlenmiştir (Toprak ve ark. 2017). Bu veri, NaHS'in retinal arterdeki gevşetici etkisinde SERCA pompası aktivasyonu ile hücre içi $[Ca^{2+}]$ 'un azaltılmasının rolünün olmadığını göstermektedir.

Vazokonstriksiyon, aktin ve myozin kontraktıl filamentlerinin birbiri ile kenetlenmesi sonucu oluşan biyolojik bir yanıttır. Bu kenetlenmenin gerçekleşmesi için MLC_{20} 'nin fosforilasyonu ve defosforilasyonu arasındaki dengenin fosforilasyon yönünde sağlanması gerekir. MLC_{20} 'nin fosforile olması, Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak gerçekleşebilse de, genellikle hücre içi Ca^{2+} artışı sonucu MHZK'nın aktivasyonuna bağlıdır (Kuo ve Ehrlich 2015). Birçok vazodilatör ajan çeşitli mekanizmalar ile hücre içi $[Ca^{2+}]$ düzeyini düşürerek ve böylece MHZK'nın aktivitesini azaltarak ya da MLC_{20} 'nin defosforilasyonunu sağlayan MP enzimini aktive ederek gevşemeye neden olmaktadır. Çalışmamızda MHZK inhibitörü ML-9 varlığında NaHS ile edilen gevşeme yanıtının kontrol yanıtlardan farklı olmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu, NaHS'in gevşetici etkisinin, MHZK inhibisyonu ve hücre içi $[Ca^{2+}]$ 'un azaltılmasıyla ilişkili olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda, Ca^{2+} 'dan bağımsız bazı yolakların gevşetici etkiye aracılık ettiğini ve kontraktıl myofilamentleri Ca^{2+} 'a karşı duyarsızlaştırdığını düşündürmektedir. Bulgularımızın aksine, akciğer epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada NaHS inkübasyonunun MHZK fosforilasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Fujii ve ark. 2016). Öte yandan, çelikbaş (gökkuşağı alabalığı) arterlerinde yapılan bir çalışmada, NaHS'in kısmen MHZK'nın aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiş; ancak bu aktivasyon NaHS ile oluşan vazokonstriktör yanıtın mekanizması olarak açıklanmıştır (Dombkowski ve ark. 2004).

Vasküler tonüsün düzenlenmesinde Ca^{2+} girişini veya mobilizasyonu sağlayan sinyal yolları haricinde, Ca^{2+} konsantrasyonunda değişiklik olmaksızın, kontraktıl proteinlerin Ca^{2+} duyarlılaşmasını sağlayarak kasılma yanıtını potansiyalize eden

yolakların da önemli rolü vardır. Ca^{2+} duyarlılaşması, MP'nin inaktivasyonu ile MLC_{20} fosforilasyonunun devam ettirilmesine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ca^{2+} duyarlılaşmasına aracılık eden başlıca yollar PKC ve RhoA/Rho kinaz aktivasyonudur. Rho kinaz ve PKC kadar sık görülmesi de, Tirozin kinaz yolağının da Ca^{2+} duyarlılaşmasına yol açtığı bilinmektedir (Akata 2007b; Liu ve Khalil 2018).

PKC, vasküler tonüsün düzenlenmesine katkıda bulunan Ca^{2+} duyarlılaştırıcı yolların önemli üyelerinden birisidir. Kontraktıl agonistlerin stimülasyonu sonucu, G-protein kenetli reseptörlerin hücre içi sinyalizasyon mekanizmalarıyla açığa çıkan ikincil haberci DAG, PKC aktivasyonu sağlamaktadır. Neredeyse tüm hücre tiplerinde eksprese olan PKC, damar düz kas ve endotel hücrelerinde de lokalize olmaktadır. Ca^{2+} ile ilişkili ve Ca^{2+} 'dan bağımsız birçok mekanizmada rol oynayarak vazokonstriksiyona katkı sağlamaktadır (Liu ve Khalil 2018). PKC'nin MYPT1 fosforilasyonu (El-Yazbi ve ark. 2015), CPI-17 fosforilasyonu (Woodsome ve ark. 2001), MP'nin heterotrimerik yapısının değişimi (Tóth ve ark. 2000) ve kalponin aktivasyonu ile Ca^{2+} duyarlılaşmasına aracılık ettiği bildirilmektedir (Liu ve Khalil 2018). Çalışmamızda PKC inhibitörü Calphostin C varlığında, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile kastırılan retinal arterlerde NaHS'in gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. İnhibitör varlığında elde edilen gevşeme yanıtları kontrol yanıtlardan farklılık göstermemiştir. Bulgularımız, NaHS'in retinal arterde PKC yolağı üzerinden Ca^{2+} duyarlılaşmasını engelleyerek etki etmediğini göstermektedir. Tavşan mide düz kaslarında yapılan bir çalışmada ise bulgularımızdan farklı olarak, endojen ve ekzojen H_2S 'in gevşetici etkisine kısmi olarak PKC inhibisyonunun aracılık ettiği bildirilmiştir (Nalli ve ark. 2015).

Tirozin kinaz, vasküler tonüsün regülasyonuna çeşitli mekanizmalar aracılığıyla katkı sağlamaktadır. BK inhibisyonu, VOCC aktivasyonu ve SR'den hücre içine Ca^{2+} geçişinin arttırılmasına aracılık ederek vazokonstriksiyonu Ca^{2+} bağımlı yollar ile desteklemektedir. Bunlara ek olarak, Tirozin kinaz GEF'leri aktive ederek RhoA/Rho kinaz yolağı aracılığıyla Ca^{2+} duyarlılaşmasına katkıda bulunmaktadır (Somylo ve Somylo, 2003; Akata 2007b). Çalışmamızda tirozin kinaz inhibitörü Triphostin 23 varlığında $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile kastırılan retinal arterlerde NaHS ile indüklenen gevşeme yanıtı değerlendirilmiştir. İnhibitör varlığında elde edilen gevşeme yanıtları kontrol

yanıtlardan farklılık göstermemiştir. Bulgularımız, NaHS'in retinal arterde tirozin kinaz yolağı üzerinden Ca^{2+} duyarlılaşmasını engelleyerek etki etmediğini göstermektedir.

Rho A/Rho kinaz birbirinden farklı mekanizmalar ile aktif hale gelerek Ca^{2+} duyarlılaşmasını sağlayan önemli yollardan biridir. Kontraktil agonistlerin reseptör stimülasyonu ile aktive olan RhoA, Rho kinaz enzimini aktif hale getirerek duyarlılaşmayı başlatır. Rho kinaz MP'nin MYPT1 subünitesini fosforilleyerek enzimi inhibe eder. MP inaktivasyonu MLC_{20} 'nin defosforilasyonu engelleyerek kasılma yanıtına katkıda bulunur (Liu ve Khalil 2018). Çalışmamızda Rho kinaz inhibitörü Y27632 varlığında $PGF_{2\alpha}$ ile kastırılan retinal arterlerde NaHS ile indüklenen gevşeme yanıtı değerlendirilmiştir. İnhibitör varlığında elde edilen gevşeme yanıtları kontrol yanıtlardan farklılık göstermemiştir. Bulgularımız, NaHS'in retinal arterde RhoA/Rho kinaz yolağı üzerinden Ca^{2+} duyarlılaşmasını engelleyerek etki etmediğini göstermektedir. Myograf bulgularımız Western blot ile retinal arterde RhoA ve Rho kinaz protein ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmalar ile desteklenmiştir. Bazal koşulda retinal arterde her iki proteinin de eksprese olduğu gözlenirken, $PGF_{2\alpha}$ ile inkübe edilen grupta Rho A ve Rho kinazın protein ekspresyonunun kontrole kıyasla anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu artış $PGF_{2\alpha}$ 'nın retinal arterlerde Rho A/Rho kinaz yolağını stimüle ettiğini ve indüklenen kasılma yanıtında Rho A/Rho kinaz yolağının aktivasyonuna bağlı Ca^{2+} duyarlılaşmasının kısmen rolü olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, $PGF_{2\alpha}$ + NaHS ile inkübe edilen grupta, Rho A ve Rho kinaz'ın protein düzeyleri tek başına $PGF_{2\alpha}$ ile inkübe edilen grubun protein düzeylerinden farklı bulunmamıştır. Bu sonuçlar, NaHS'in retinal arterdeki gevşetici etkisinde Rho A/Rho kinaz yolağının inhibisyonunun rolü olmadığını desteklemektedir. Bulgularımıza benzer olarak, $PGF_{2\alpha}$ ile prekontrakte edilen fare gastrik fundus ve distal kolon düz kaslarında yapılan bir çalışmada NaHS'in Ca^{2+} duyarlılaşmasını inhibe ederek gevşetici etki gösterdiği ancak bu etkinin Rho kinaz inhibisyonundan bağımsız olduğu bildirilmiştir (Dhaese and Lefebvre 2009; Dhaese ve ark. 2010). Bulgularımızdan farklı olarak, literatürde NaHS'in özellikle non-vasküler dokuları gevşetici etkisinde Rho kinaz yolağının rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, tavşan mide düz kaslarında yapılan bir çalışmada endojen ve ekzojen H_2S 'in kısmi olarak Rho kinaz inhibisyonu ile gevşemeye neden olduğu rapor edilmiştir (Nalli ve ark. 2015). Tavşan kolon düz kaslarında yapılan çalışmada ise, karbakol

uygulanması ile aktif hale gelen Rho A/Rho kinaz yolağının L-sistein ve NaHS ile inhibe olduğu ve bu inhibisyonun sorumlu mekanizmanın Rho A sülfhidrasyonu olduğu gösterilmiştir (Nalli ve ark. 2017). Ek olarak, fare korpus kaverosumunda yapılan bir çalışmada NaHS'in gevşetici etkisine aracılık eden mekanizmalardan birisinin Rho kinaz inhibisyonu olduğu bildirilmiştir (Aydınoğlu and Öğülener 2017). NaHS'in vazodilatör etkisinin örnekendirildiği çalışmalarda Rho kinaz ile ilişkisini değerlendiren bir çalışma dikkati çekmemiştir. Bununla birlikte, NaHS'in koroner damar yatağındaki kastırıcı etkisinin kısmi olarak Rho kinaz aktivasyonuna bağımlı olduğu gösterilmiştir (Ping ve ark. 2015).

MP damar düz kaslarında eksprese olan ve MLC_{20} 'yi defosforile ederek vazodilatasyon sağlayan bir enzimdir. MP'nin inhibisyonu MLC_{20} 'nin defosforilasyonunu önlemekte ve myofilamentleri Ca^{2+} 'a duyarlı hale getirerek kasılma yanıtını potansiyalize etmektedir. Ca^{2+} duyarlılaşmasının temelini MP enziminin inhibisyonu oluşturmaktadır. PKC, tirozin kinaz ve Rho kinaz vb. yollar MP enziminin MYPT1 subünitesinin fosforilasyonu üzerinden MP'yi inaktive ederek Ca^{2+} duyarlılaşmasına neden olurlar (Akata 2007b). Çalışmamızda NaHS'in gevşetici etkisinde MP'nin rolü myograf ve Western blot çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Myograf deneylerinde, MP inhibitörü Calyculin A ile inkübe edilen retinal arterlerde oluşan kasılma üzerinde NaHS'in gevşetici etkisinin kontrole kıyasla belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma, sığır retinal arterinde NaHS aracılı gevşetici etkinin önemli ölçüde MP enziminin aktivasyonu ile kontraktil proteinlerin Ca^{2+} duyarlılığının inhibisyonu sonucu gerçekleştiğini göstermektedir. Western blot deneyleri ile elde edilen bulgular myograf sonuçlarını destekler niteliktedir. MP enziminin düzenleyici subünitesini olan MYPT1'in fosforilasyonu, MP enziminin inaktive olup vazokonstriksiyona aracılık etmesini sağlayan bir durumdur. Bu durumun tersi yani MYPT1 fosforilasyonunun azalması ise MP'yi aktif hale getirerek vazodilatasyonu sağlamaktadır (Hirano ve ark 2004). Retinal arterde fosforile olan MYPT1 (p-MYPT) protein düzeylerini incelediğimizde, kontrol ve $PGF_{2\alpha}$ ile inkübe edilen gruplarda MYPT1'in fosforile halde olduğu ve fosforilasyon düzeyleri arasında fark olmadığı gözlenmiştir. $PGF_{2\alpha}$ + NaHS ile inkübe edilen retinal arter grubunda ise p-MYPT düzeyleri, hem kontrol hem de $PGF_{2\alpha}$ ile inkübe edilen gruplara kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. p-MYPT düzeylerindeki

azalma, NaHS'in MYPT fosforilasyonunu inhibe ederek MP enziminin aktivasyonunu sağladığına işaret etmektedir. Bulgularımızı destekleyici olarak, fare mide fundusunda (Dhaese ve Lefebvre 2009), tavşan mide düz kaslarında (Nalli ve ark. 2015) ve sıçan jejunumu sirküler düz kaslarında (Nagao ve ark. 2012) NaHS'in gevşetici etkisinden sorumlu mekanizmanın kısmen MP aktivasyonu olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, fare distal kolonunda meydana gelen NaHS aracılı gevşemenin, Ca^{2+} duyarsızlaşması ile ilişkili olmakla birlikte MP aktivasyonundan bağımsız olduğu bildirilmiştir (Dhaese ve ark. 2010). Ayrıca, NaHS'in sıçan mezenterik arterindeki gevşetici etkisinde p-MYPT düzeylerinde bir değişikliğin rol oynamadığı rapor edilmiştir (Hedegaard ve ark. 2015).

Western Blot bulgularımızda dikkati çeken bir husus, $PGF_{2\alpha}$ ile inkübe edilen retinal arterlerde MYPT1 protein ekspresyonunun dinlenim durumundaki yani Kontrol grubu arterlerinden farklı olmaması, NaHS ilavesinin ise kontrol ve $PGF_{2\alpha}$ gruplarına göre MYPT1 protein ekspresyonunu azaltmış olmasıdır. MYPT1'in sıklıkla fosforile olarak Ca^{2+} duyarlılaşmasını düzenleyen iki bölgesi vardır. Bunlar T696 ve T853 bölgeleridir. Ca^{2+} duyarlılaşmasına aracılık eden kinazlar genellikle T696 bölgesini tercih etse de, T853'ü fosforile eden enzimler de mevcuttur. Örneğin, Rho kinazın her iki bölgeyi de fosforile ederek Ca^{2+} duyarlılaşmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kawano ve ark. 1999; Hirano ve ark. 2007). Tavşan aortasında yapılan bir çalışmada $PGF_{2\alpha}$ 'nın MYPT1'i T696 bölgesinden fosforilleyerek MP'nin inaktivasyonunu, dolayısıyla MLC₂₀ defosforilasyonunun inhibisyonunu ve böylece Ca^{2+} duyarlılaşmasını sağladığı bildirilmiştir (Ito et al., 2003). Retinal arterde $PGF_{2\alpha}$ ile MYPT1 fosforilasyonunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda retinal arterde MYPT1'in T696 bölgesinden fosforilasyonu ölçülmüştür. Retinal arterde kontrol ve $PGF_{2\alpha}$ ile inkübe edilen deney gruplarında p-MYPT protein düzeyleri birbirinden farklı bulunmamıştır. Tavşan portal veni ve vas deferens düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada istirahat membran potansiyelinde MYPT1'nin T695 bölgesinden fosforile halde bulunduğu ve bu durumun bazal tonüse katkı sağladığı rapor edilmiştir (Kitazawa ve ark. 2003). Aynı çalışmada fenilefrin, endotelin-1 gibi G protein ile kenetli kontraktil agonsitler ile stimülasyonun MYPT1'in T695 fosforilasyon düzeylerini değiştirmediği, aksine T853 bölgesinden fosforilasyonu arttırdığı ve bu fosforilasyonun kasılma yanıtları ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde fare femoral arterinde yapılan bir çalışmada arterin bazal durumda MYPT1'in T696 bölgesinden fosforile

olduğu ve prekontraksiyon amacıyla TXA₂ analogu U-46619 uygulamasının T696 bölgesinin fosforilasyon düzeylerini değiştirmediği bildirilmiştir (Lubomirov ve ark. 2019). Bu verilerin ışığında, retinal arterde PGF_{2α}'ya bağlı oluşan Ca²⁺ duyarlılaşmasında MYPT1'in T696 bölgesinin fosforilasyonunun rolü olmadığı, ancak T696 fosforilasyonunun retinal arterin bazal tonüsünün düzenlenmesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Bu damar yatağında MP inhibisyonunu sağlayan tüm yolaklar henüz bilinmemektedir. Bu nedenle MP inhibisyonuna neden olan diğer yolakların retinal arterde de aktif olma ihtimali mevcuttur. Bu ihtimaller göz önünde bulundurularak, PGF_{2α}'nın MYPT1'in T696 dışında bir bölgesini (örneğin T853) fosforile ederek MP'nin inaktivasyonunu sağladığı düşünülebilir. MYPT1'in fosforilasyon düzeyleri PGF_{2α} + NaHS grubunda kontrole ve PGF_{2α} grubuna göre yaklaşık %50 azalma göstermiştir. Buna göre; NaHS'in sığır retinal arterini gevşetici etkisinin kısmen MYPT'ye ait T696 bölgesinin defosforilasyonu ile MP'nin aktivasyonunu sağlayan Ca²⁺ duyarısızlaşmasına bağlı geliştiği düşünülmektedir.

NaHS'in sığır retinal arterinde MP aktivasyonuna neden olduğunu ortaya koyan myograf ve Western blot sonuçlarımız birbirini destekler niteliktedir. Ancak, myograf deneylerinde MP inhibitörü Calyculin A'nın NaHS aracılı gevşemeyi yaklaşık %75 oranında azalttığı gözlenirken, Western blotta MP'nin aktivasyonuna aracılık eden p-MYPT protein düzeylerindeki azalmanın %50 civarında olduğu dikkati çekmiştir. Bu durum, sığır retinal arterinde NaHS'in gevşetici etkisinde MP aktivasyonuna bağlı Ca²⁺ duyarısızlaşmasında farklı mekanizmaların rol alabileceğini düşündürmektedir.

Vasküler düz kasta Ca²⁺ duyarlılaşmasını başlatan temel olay MP enziminin inaktivasyonudur. Bu inhibisyonu düzenleyen üç mekanizma; enzimin konformasyonel yapısının değişimi, CPI-17 fosforilasyonu ile PP1_C subünitesinin inhibisyonu ve MYPT1 subünitesinin fosforilasyonudur (Hirano ve ark. 2004). Ferret (dağ gelinciği) portal venine ait izole düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmanın sonuçları MP'nin heterotrimerik yapısında değişikliğe neden olarak Ca²⁺ duyarlılaşması sağlanması ile ilişkilidir. PGF_{2α} uygulanan hücrelerde, dinlenim durumunda sitozolde birlikte bulunan MYPT ve PP1_C subünitelerinin lokalizasyonunun değiştiği ve birbirinden ayrıldığı gösterilmiştir. MYPT ve PP1_C subünitelerinin ayrılması MP'nin konformasyonunu değiştirdiği için enzimi inhibe ettiği ve MLC₂₀ defosforilasyonunun inhibisyonu ile Ca²⁺ duyarlılaşmasına neden olarak PGF_{2α} aracılı kasılma yanıtının oluşumuna katkı

sağladığı belirtilmiştir (Shin ve ark. 2002; Hirano ve ark. 2004). Bu doğrultuda, sığır retinal arterinde $\text{PGF}_{2\alpha}$ 'nın oluşturduğu kasılma yanıtı, portal vendekine benzer şekilde konformasyonel yapı değişimi sebebiyle MP enziminin inaktivasyonuna bağlı olabilir. Tüm bu ihtimallerin değerlendirilmesi ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç göstermektedir.

CPI-17, T38 bölgesinden fosforile olarak aktifleşen, MP enzimini PP1_C subünitesini fosforilleyerek inaktive eden ve Ca^{2+} duyarlılaşmasına aracılık eden bir proteindir. CPI-17, PKC, Rho kinaz ve diğer bazı kinazlar tarafından fosforillenerek aktif hale getirilir ve böylece MP'yi inhibe eder (Hirano ve ark. 2004). NaHS'in retinal arterde oluşturduğu gevşetici etkide CPI-17 aracılıklı yolağın muhtemel rolü, kontrol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ve $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{NaHS}$ ile inkübe edilen retinal arter gruplarında p-CPI-17 protein düzeyleri üzerinden Western blot ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda CPI-17 proteininin retinal arterde eksprese olduğu ancak, $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{NaHS}$ grubundaki fosforilasyon düzeylerinin kontrole veya $\text{PGF}_{2\alpha}$ uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği gözlenmiştir. Elde edilen veriler; retinal arterde $\text{PGF}_{2\alpha}$ ile meydana gelen kasılmada CPI-17 fosforilasyonuna bağlı Ca^{2+} duyarlılaşmasının, NaHS'e bağlı gevşeme mekanizmasında ise CPI-17 defosforilasyonunun rolünün olmadığına işaret etmektedir. Tavşan mide düz kaslarında yapılan bir çalışmada ise bulgularımızdan farklı olarak, karbakol ile inkübasyonun PKC aracılı olarak CPI-17 fosforilasyon düzeylerini arttırdığı, endojen ve ekzojen H_2S 'in ise PKC inhibisyonu ile p-CPI-17 düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Tavşan mide düz kaslarındaki kasılma yanıtında CPI-17 fosforilasyonunun rolü, gevşeme yanıtında ise CPI-17 fosforilasyonunun inhibisyonu sonucu MP inaktivasyonunun rolü olduğu bildirilmiştir (Nalli ve ark. 2015).

Çalışmamızda NaHS'in retinal arterdeki gevşetici etkisini Ca^{2+} duyarlılaşması ile ilgili mekanizmalar üzerinden değerlendirdikten sonra, gözde endojen olarak sentezlenen bir gazotransmitter olan H_2S 'i sentezleyen enzimlerin (CBS, CSE ve 3-MST) retinal arterdeki ve retinadaki varlığının, miktarının ve dağılımlarının incelenmesi ve bu konuda literatürde yer almayan orijinal verilerin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Sığır gözünde H_2S 'in endojen olarak üretildiği ve miktarının dokulara göre farklılık gösterdiği bilinmektedir. Retina ve korneada en fazla miktarda ölçülen H_2S 'in; bu iki doku haricinde aköz humor, iris, siliyer kas, lens ve koroid tabakalarında olduğu gösterilmiştir (Mikami ve ark. 2011; Han ve ark. 2019). Santral sinir sisteminde baskın

olan CBS enziminin gözün farklı kısımlarında H_2S 'in sentezine aracılık ettiği gösterilmiştir. CBS'nin en çok bulunduğu bölgeler kornea, konjonktiva ve iris iken; retina ve optik sinirde daha az bulunduğu bildirilmiştir (Persa ve ark. 2006). CSE ve CAT/3-MST enzimlerinin de memeli retinasında eksprese olduğu gösterilmiştir (Pong ve ark. 2007). Ayrıca, bir çalışmada fare retinasında H_2S sentezinde tercih edilen baskın yolağın CAT/3-MST olduğu ve bu enzimlerin retinal nöronlarda eksprese olduğu rapor edilmiştir. Fakat, semender retinasında eksprese olan CBS ile CSE enzimlerinin, fare retinal nöronlarında bulunmadığı gözlenmiştir (Pong ve ark. 2007; Mikami ve ark. 2011).

H_2S 'in sentezinden sorumlu enzimlerle ilgili retinada bugüne kadar yapılan birçok incelemeye karşın, sığır retinal arterinde CBS, CSE ve 3-MST enzimlerini protein düzeyinde değerlendiren bir çalışma dikkati çekmemektedir. ELISA bulguları, CBS, CSE ve 3-MST enzimlerinin hem retinada hem de retinal arterde bulunduğunu ortaya koymuştur. Her üç enzimin retinal arterdeki ekspresyon düzeylerinin retinadaki miktarlarına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hem retinada hem de retinal arterde 3-MST enziminin miktarının CBS ve CSE'ye kıyasla daha düşük olduğu, CSE düzeylerinin ise CBS ve 3-MST'ye göre daha yüksek seyrettiği belirlenmiştir. Bu verilere göre sığır retinası ve retinal arterinde H_2S 'in endojen olarak sentezlendiği ve her iki dokuda sentezine aracılık eden enzimin başlıca CSE olduğu değerlendirilmiştir. Bulgularımıza benzer şekilde, fare retinasında yapılan bir çalışmada, CBS, CSE ve 3-MST enzimlerinin her üçünün de retinada eksprese olduğu gösterilmiştir (Gersztenkorn ve ark. 2016).

Çalışmamızın son kısmında ise, H_2S 'i sentezleyen enzimlerin varlığını ve miktarını gösterdiğimiz ELISA bulgularımızı desteklemek üzere, immünofloresans mikroskopik analiz ile her iki dokuda yüksek düzeylerde tespit edilen CBS ve CSE enzimlerinin dağılımları değerlendirilmiştir. Immünofloresans yöntemiyle görüntülenen retina ve retinal arterde CBS enziminin CSE enzimine göre daha az eksprese olduğu gözlenmiştir.

CBS enziminin retinada özellikle koni ve çomak hücreleri ile ganglion hücre tabakasında; retinal arterde ise damar düz kas hücrelerinde yoğunlaştığı, retinal arterin endotel tabakasında da kısmi olarak bulunduğu belirlenmiştir.

Retina ve retinal arterde daha fazla eksprese olan CSE enziminin ise retinada koni ve çomak hücrelerinde, gangliyon hücrelerinde ve bipolar hücrelerde; retinal arterde ise özellikle endotel hücrelerinde yoğunlaştığı belirlenmiştir.

CBS'nin retinal gangliyon hücrelerinde bulunduğunu ortaya koyan bulgularımız ile benzer olarak, fare retinasında yapılan bir çalışmada CBS enziminin retinal gangliyon hücrelerinde, müller hücrelerinde, retinal pigment epitel tabakasında bulunduğu bildirilmiştir (Markand ve ark. 2013). Farklı memeli türleriyle yapılan ve CBS ve CSE enzimlerinin retina tabakasındaki dağılımları inceleyen bir çalışmada ise köpek, primat ve insan retinasında her iki enzimin de ortak olarak bulunduğu tabakaların fotoreseptörler, dış pleksiform tabaka ve gangliyon hücre tabakası olduğu gösterilmiştir (Badiei ve ark. 2019). Bulgularımız her iki enzimin fotoreseptörler ve gangliyon hücrelerindeki ekspresyonunu desteklemektedir. Yine aynı çalışmada köpek retinasında CBS'nin eksprese olduğu hücrelerin çomak, amakrin, horizontal ve gangliyon hücreleri olduğu, CSE'nin ise retinal pigment epitel, koni ve Müller hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir (Badiei ve ark. 2019). Köpek retinasında CBS ve CSE'nin fotoreseptör ve gangliyon hücre tabakasındaki dağılımı ise sığır retinası ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile NaHS'in sığır retinal arterindeki gevşetici etkisinde Ca^{2+} duyarlılaştırıcı yolların rolü ilk kez değerlendirilmiştir. Orijinal verileri olan çalışmamızın sonuçlarının bu alanlardaki literatüre önemli katkı sağlayacağı kanaatindeyiz. Bulgularımız, NaHS'in sığır retinal arterini gevşetici etkisinde ekstraselüler kalsiyumun rolü olmadığını, etkiden sorumlu asıl mekanizmanın Ca^{2+} duyarlaşmasının inhibisyonu (Ca^{2+} duyarsızlaşması) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Elde edilen verilerden, Ca^{2+} duyarsızlaşmasının MP enziminin MYPT1 subünitesinin T696 bölgesinin fosforilasyonunun inhibisyonu aracılığıyla ve MP enziminin aktivasyonu sonucu gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan temel yollardan Rho A/Rho kinaz, PKC veya tirozin kinazın NaHS'in retinal arteri gevşetici etkisinde rolü olmadığı ortaya konmuştur. Bu yollar Ca^{2+} duyarlılaşmasında önemli role sahip olsa da; retinal arterde etkin olmadıkları anlaşılmaktadır. $PGF_{2\alpha}$ stimülasyonu retinal arterde Rho A/Rho kinaz yolağını aktif hale getirirse de bu yolağın inhibisyonu NaHS'e bağlı gevşeme yanıtında rol oynamamaktadır. Dolayısıyla, retinal arter tonüsünün ve NaHS aracılı vazodilatasyonun düzenlenmesinde Ca^{2+} duyarlılaşması sağlayan farklı kinazların rolünün olabileceği düşünülmektedir. ILK, PAK, zip kinaz

veya zip benzeri kinaz bu kinazlara örnek olarak verilebilir (Hirano ve ark. 2004). Ancak hangi kinazların retinal arterde eksprese olduğu, hangilerinin MP'yi inhibe ederek Ca^{2+} duyarlılaşması sağladığı veya NaHS'in hangilerini inhibe etmek suretiyle MP'yi aktif hale getireceğinin aydınlatılabilmesi için bu alanda yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

H_2S 'in kardiyovasküler sistem ve oküler hastalıklardaki rolü ile terapötik potansiyeli göz önünde bulundurulduğunda, NaHS'in sıgır retinal arterindeki gevşetici etkisinin mekanizmasının bilinmesinin önemi anlaşılmaktadır. Çalışmamız NaHS'in gevşetici etkisinin mekanizmasına yönelik olarak önemli ve yeni verileri ortaya koymuştur. Mekanizmayı tamamıyla ortaya koymak üzere Ca^{2+} duyarlılaşmasında rolü olan ve henüz araştırılmamış diğer kinazlarla ilgili moleküler çalışmalar yapmayı hedeflemekteyiz.

Çalışmamızın H_2S 'i sentezleyen enzimlerle ilgili kısmında ise; CBS, CSE ve 3-MST'nin retinal arterde daha fazla olmak üzere, hem retina hem de retinal arterde protein düzeyinde eksprese olduğu ve ayrıca, CSE'nin her iki dokuda da diğerlerine göre daha fazla miktarda bulunduğu ortaya konmuştur. Retina ve retinal arterde daha yüksek düzeyde eksprese olduğu belirlenen CBS ve CSE enzimlerinin bu dokulardaki dağılımları değerlendirildiğinde; endotelde baskın olan enzimin CSE olduğunu, CBS enziminin endotel tabakasında bulunsu da düz kas hücrelerinde daha fazla bulunduğu göstermiştir. CBS ve CSE enzimlerinin retinadaki dağılımında ise koni hücreleri, çomak hücreleri ve retinal gangliyon hücrelerinde bulunmaları yönünden benzerlik göstermektedir. Ek olarak, CSE bipolar hücrelerde de gözlenmiştir. Literatürde, retinal arterde H_2S 'i sentezleyen enzimlerin varlığını ve miktarını ortaya koyan ya da CBS ve CSE enziminin retina ve retinal arter tabakalarındaki dağılımını gösteren herhangi bir araştırma dikkati çekmemektedir. Çalışmamız bu yönleriyle de orjinal bulguları içermektedir. Bununla birlikte, bu enzimlerinin aktivitelerinin ve bulundukları tabakalardaki fonksiyonlarının belirlenmesi için bu alanda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bulgularımızın bahsi geçen çalışmalarla desteklenmesi durumunda, H_2S 'in oküler hastalıklardaki rolü ve tedavideki yerinin daha net bir şekilde ortaya konulacağı ve bu alandaki ileri çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aalbaek, F., Bonde, L., Kim, S., & Boedtkjer, E. (2015). Perivascular tissue inhibits rho-kinase-dependent smooth muscle Ca²⁺ sensitivity and endothelium-dependent H₂S signalling in rat coronary arteries. *Journal of Physiology*, 593(21), 4747–4764. <https://doi.org/10.1113/JP271006>
- Abe, K., & Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 1066–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558235>
- Ahluwalia, A., MacAllister, R. J., & Hobbs, A. J. (2004). Vascular actions of natriuretic peptides - Cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Basic Research in Cardiology*. <https://doi.org/10.1007/s00395-004-0459-6>
- Akata, T. (2007a). Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: Basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *Journal of Anesthesia*. <https://doi.org/10.1007/s00540-006-0487-5>
- Akata, T. (2007b). Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: Regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. *Journal of Anesthesia*. <https://doi.org/10.1007/s00540-006-0488-4>
- Al-Magableh, M. R., & Hart, J. L. (2011). Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383(4), 403–413. <https://doi.org/10.1007/s00210-011-0608-z>
- Allsop, J., & Watts, R. W. E. (2015). Methionine Adenosyltransferase, Cystathionine β -Synthase and Cystathionine γ -Lyase Activity of Rat Liver Subcellular Particles, Human Blood Cells and Mixed White Cells from Rat Bone Marrow. *Clinical Science*, 48(6), 509–513. <https://doi.org/10.1042/cs0480509>

- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., ... Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20246–20249. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20246>
- Arifoğlu Y (2017). *Her Yönüyle Anatomi*. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri.
- Aviv, A. (1994). Cytosolic Ca^{2+} , Na^{+}/H^{+} antiport, protein kinase C in essential hypertension. *American Journal of Hypertension*, 7(2), 205–212. <https://doi.org/10.1093/ajh/7.2.205>
- Aydinoglu, F., & Ogulener, N. (2017). The role of arachidonic acid/cyclooxygenase cascade, phosphodiesterase IV and Rho-kinase in H_2S -induced relaxation in the mouse corpus cavernosum. *Pharmacological Reports*, 69(4), 610–615. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.02.018>
- Badiei, A., Sudharsan, R., Santana, E., Dunaief, J. L., & Aguirre, G. D. (2019). Comparative localization of cystathionine beta synthases and cystathionine gamma lyase in canine, non-human primate and human retina. *Experimental Eye Research*, 181, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.01.007>
- Bagur, R., & Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca^{2+} Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>
- Baskar, R., & Bian, J. (2011). Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.052>
- Begum, N., Sandu, O. A., Ito, M., Lohmann, S. M., & Smolenski, A. (2002). Active Rho kinase (ROK- α) associates with insulin receptor substrate-1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6214–6222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110508200>
- Bełtowski, J. (2013). Endogenous hydrogen sulfide in perivascular adipose tissue: role in the regulation of vascular tone in physiology and pathology. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(11), 889–898. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2013-0001>
- Bełtowski, J. (2015). Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine - An update. *Pharmacological Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.01.005>

- Benavides, G. A., Squadrito, G. L., Mills, R. W., Patel, H. D., Isbell, T. S., Patel, R. P., ... Kraus, D. W. (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 17977–17982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705710104>
- Biermann, J., Lagreze, W. A., Schallner, N., Schwer, C. I., & Goebel, U. (2011). Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury. *Molecular Vision*, 17, 1275–1286. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3103742/pdf/mv-v17-1275.pdf>
- Boussery, K., Delaey, C., & Van De Voorde, J. (2005). The vasorelaxing effect of CGRP and natriuretic peptides in isolated bovine retinal arteries. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(4), 1420–1427. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-1093>
- Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C., ... Cirino, G. (2010). Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(10), 1998–2004. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.209783>
- Cheang, W. S., Wong, W. T., Shen, B., Lau, C. W., Tian, X. Y., Tsang, S. Y., ... Huang, Y. (2010). 4-Aminopyridine-sensitive K⁺ channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery. *Vascular Pharmacology*, 53(3–4), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2010.04.004>
- Chen, X., Jhee, K. H., & Kruger, W. D. (2004). Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52082–52086. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400481200>
- Cheng, Y., Ndisang, J. F., Tang, G., Cao, K., & Wang, R. (2004). Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(5), H2316–H2323. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00331.2004>
- Chitaley, K., & Webb, R. C. (2002). Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of Rho-kinase signaling. In *Hypertension* (Vol. 39, pp. 438–442).

<https://doi.org/10.1161/hy02t2.102960>

- Chitnis, M. K., Njie-Mbye, Y. F., Opere, C. A., Wood, M. E., Whiteman, M., & Ohia, S. E. (2013). Pharmacological actions of the slow release hydrogen sulfide donor GYY4137 on phenylephrine-induced tone in isolated bovine ciliary artery. *Experimental Eye Research*, 116, 350–354. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.10.004>
- Clapp, L. H., & Tinker, A. (1998). Potassium channels in the vasculature. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. <https://doi.org/10.1097/00041552-199801000-00015>
- Cooper, C. E., & Brown, G. C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: Chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9166-6>
- Cottet, S., & Schorderet, D. (2009). Mechanisms of Apoptosis in Retinitis Pigmentosa. *Current Molecular Medicine*, 9(3), 375–383. <https://doi.org/10.2174/156652409787847155>
- Mochly-Rosen, D., Das, K., Grimes, K.V. (2012). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(12), 937–957. <https://doi.org/10.1038/nrd3871>
- Daele, L. Vanden, Boydens, C., Pauwels, B., & Van de Voorde, J. (2017). The retinal relaxing factor: Update on an enigmatic regulator of the retinal circulation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20904>
- Delaey, C., & Van De Voorde, J. (1998). Retinal arterial tone is controlled by a retinal-derived relaxing factor. *Circulation Research*, 83(7), 714–720. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.7.714>
- Delaey, C., & Van De Voorde, J. (2000). Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Research*. <https://doi.org/10.1159/000055622>
- Deng, J. T., Sutherland, C., Brautigan, D. L., Eto, M., & Walsh, M. P. (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochemical Journal*, 367(2), 517–524.

<https://doi.org/10.1042/bj20020522>

- Dhaese, I., & Lefebvre, R. A. (2009). Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. *European Journal of Pharmacology*, 606(1–3), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.01.011>
- Dhaese, I., Van Colen, I., & Lefebvre, R. A. (2010). Mechanisms of action of hydrogen sulfide in relaxation of mouse distal colonic smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*, 628(1–3), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.024>
- Doeller, J. E., Isbell, T. S., Benavides, G., Koenitzer, J., Patel, H., Patel, R. P., ... Kraus, D. W. (2005). Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical Biochemistry*, 341(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.03.024>
- Dombkowski, R. A., Russell, M. J., & Olson, K. R. (2004). Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(4), R678–R685. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00419.2003>
- Dombkowski, R. A., Russell, M. J., Schulman, A. A., Doellman, M. M., & Olson, K. R. (2005). Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(1), R243–R252. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00324.2004>
- Dongó, E., Beliczai-Marosi, G., Dybvig, A. S., & Kiss, L. (2018). The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.010>
- Du, J., Jin, H., & Yang, L. (2017). Role of hydrogen sulfide in retinal diseases. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00588>
- Du, S. X., Jin, H. F., Bu, D. F., Zhao, X., Geng, B., Tang, C. S., & Du, J. B. (2008). Endogenously generated sulfur dioxide and its vasorelaxant effect in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(8), 923–930. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00845.x>
- Dunn, W. R., Alexander, S. P. H., Ralevic, V., & Roberts, R. E. (2016). Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle. *Pharmacology and Therapeutics*.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.12.007>

- El-Yazbi, A. F., Abd-Elrahman, K. S., & Moreno-Dominguez, A. (2015). PKC-mediated cerebral vasoconstriction: Role of myosin light chain phosphorylation versus actin cytoskeleton reorganization. *Biochemical Pharmacology*, 95(4), 263–278. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.011>
- Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L., ... Lefer, D. J. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15560–15565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705891104>
- Eto, M., Senba, S., Morita, F., & Yazawa, M. (1997). Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: Its specific localization in smooth muscle. *FEBS Letters*, 410(2–3), 356–360. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00657-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00657-1)
- Evans, A. M., Cobban, H. J., & Nixon, G. F. (1999). ET(A) receptors are the primary mediators of myofilament calcium sensitization induced by ET-1 in rat pulmonary artery smooth muscle: A tyrosine kinase independent pathway. *British Journal of Pharmacology*, 127(1), 153–160. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702548>
- Fang, L., Zhao, J., Chen, Y., Ma, T., Xu, G., Tang, C., ... Geng, B. (2009). Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. *Journal of Hypertension*, 27(11), 2174–2185. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328330a900>
- Fernandes, V. S., Ribeiro, A. S. F., Barahona, M. V., Orensanz, L. M., Martínez-Sáenz, A., Recio, P., ... Hernández, M. (2013). Hydrogen sulfide mediated inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck: Role of KATP channels, sensory nerves and calcium signaling. *Journal of Urology*, 190(2), 746–756. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.02.103>
- Freitas, M. R., Eto, M., Kirkbride, J. A., Schott, C., Sassard, J., & Stoclet, J. C. (2009). Y27632, a Rho-activated kinase inhibitor, normalizes dysregulation in alpha1-adrenergic receptor-induced contraction of Lyon hypertensive rat artery smooth muscle. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 23(2), 169–178. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00658.x>

- Fujii, Y., Funakoshi, T., Unuma, K., Noritake, K., Aki, T., & Uemura, K. (2016). Hydrogen sulfide donor NaHS induces death of alveolar epithelial L2 cells that is associated with cellular shrinkage, transgelin expression and myosin phosphorylation. *The Journal of Toxicological Sciences*, 41(5), 645–654. <https://doi.org/10.2131/jts.41.645>
- Furne, J., Saeed, A., & Levitt, M. D. (2008). Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5), R1479–R1485. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90566.2008>
- Furne, J., Springfield, J., Koenig, T., DeMaster, E., & Levitt, M. D. (2001). Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: A specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical Pharmacology*, 62(2), 255–259. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00657-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00657-8)
- Geng, B., Cui, Y., Zhao, J., Yu, F., Zhu, Y., Xu, G., Zhang, Z., Tang, C., Du, J. (2007). Hydrogen sulfide downregulates the aortic l -arginine/nitric oxide pathway in rats . *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(4), R1608–R1618. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00207.2006>
- Gersztenkorn, D., Coletta, C., Zhu, S., Ha, Y., Liu, H., Tie, H., Zhou, J., Szabo, C., Zhang, W., Motamedi, M. (2016). Hydrogen sulfide contributes to retinal neovascularization in Ischemia-Induced retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(7), 3002–3009. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18555>
- Gheibi, S., Jeddi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2018). Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.017>
- Ghosh, D., Syed, A. U., Prada, M. P., Nystoriak, M. A., Santana, L. F., Nieves-Cintrón, M., & Navedo, M. F. (2017). Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 78, pp. 49–87). <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.08.002>
- Gibson, A., McFadzean, I., Wallace, P., & Wayman, C. P. (1998). Capacitative Ca²⁺ entry and the regulation of smooth muscle tone. *Trends in Pharmacological Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(98\)01222-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(98)01222-X)

- Golan, D.E. (Ed.). (2012). *Principles of Pharmacology* (3. Baskı). Pensilvanya, Lippincott Williams&Wilkins
- Guo, Q., Wu, Y., Xue, H., Xiao, L., Jin, S., & Wang, R. (2016). Perfusion of isolated carotid sinus with hydrogen sulfide attenuated the renal sympathetic nerve activity in anesthetized male rats. *Physiological Research*, 65(3), 413–423.
- Gupta, N., & Singh, G. (2018). *Anatomy, Head and Neck, Eye Arteries*. StatPearls. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30725748>
- Guyton, A.C ve Hall, J.E. (2007). *Tıbbi Fizyoloji* (11. Baskı) İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Hamaguchi, T., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Koyama, M., Machida, H., ... Nakano, T. (2000). Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(3), 825–830. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3225>
- Han, Y., Shang, Q., Yao, J., & Ji, Y. (2019). Hydrogen sulfide: a gaseous signaling molecule modulates tissue homeostasis: implications in ophthalmic diseases. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1525-1>
- Hartshorne, D. J., Ito, M., & Erdödi, F. (1998). Myosin light chain phosphatase: Subunit composition, interactions and regulation. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. <https://doi.org/10.1023/A:1005385302064>
- Hayreh, S. S., Zimmerman, M. B., Kimura, A., & Sanon, A. (2004). Central retinal artery occlusion. Retinal survival time. *Experimental Eye Research*, 78(3), 723–736. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00214-8)
- Hedegaard, E. R., Goulliaev, A., Winther, A. K., Arcanjo, D. D. R., Aalling, M., Renaltan, N. S., ... Simonsen, U. (2015). Involvement of Potassium Channels and Calcium-Independent Mechanisms in Hydrogen Sulfide-Induced Relaxation of Rat Mesenteric Small Arteries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 356(1), 53–63. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227017>
- Hilgers, R. H. P., Todd, J., & Webb, R. C. (2007). Increased PDZ-RhoGEF/RhoA/Rho kinase signaling in small mesenteric arteries of angiotensin II-induced hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 25(8), 1687–1697. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32816f778d>

- Himpens, B., Kitazawa, T., & Somlyo, A. P. (1990). Agonist-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 417(1), 21–28. <https://doi.org/10.1007/BF00370764>
- Hirano, K., Hirano, M., & Kanaide, H. (2004). Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle. *Journal of Smooth Muscle Research*, 40(6), 219–236. <https://doi.org/10.1540/jsmr.40.219>
- Horman, S., Morel, N., Vertommen, D., Hussain, N., Neumann, D., Beauloye, C., ... Rider, M. H. (2008). AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18505–18512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802053200>
- Hosoki, R., Matsuki, N., & Kimura, H. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 527–531. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6878>
- Huang, S., Huang, P., Liu, X., Lin, Z., Wang, J., Xu, S., ... Zhong, Y. (2017). Relevant variations and neuroprotective effect of hydrogen sulfide in a rat glaucoma model. *Neuroscience*, 341, 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.019>
- Hughes, A. D., & Wijetunge, S. (1998). Role of tyrosine phosphorylation in excitation-contraction coupling in vascular smooth muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 164(4), 457–69. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.00446.x>
- Hughes, M. N., Centelles, M. N., & Moore, K. P. (2009). Making and working with hydrogen sulfide. The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.018>
- Inagaki, M., Yokokura, H., Itoh, T., Kanmura, Y., Kuriyama, H., & Hidaka, H. (1987). Purified rabbit brain protein kinase C relaxes skinned vascular smooth muscle and phosphorylates myosin light chain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 254(1), 136–141. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90089-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90089-0)
- Ishigami, M., Hiraki, K., Umemura, K., Ogasawara, Y., Ishii, K., & Kimura, H. (2008).

- A Source of Hydrogen Sulfide and a Mechanism of Its Release in the Brain. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(2), 205–214. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2132>
- Ito, K., Shimomura, E., Iwanaga, T., Shiraishi, M., Shindo, K., Nakamura, J., ... Takuwa, Y. (2003). Essential role of rho kinase in the Ca²⁺ sensitization of prostaglandin F₂ α -induced contraction of rabbit aortae. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.030775>
- Jackson-Weaver, O., Osmond, J. M., Riddle, M. A., Naik, J. S., Bosc, L. V. G., Walker, B. R., & Kanagy, N. L. (2013). Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and smooth muscle Ca²⁺ sparks. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 304(11), H1446–H1454. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00506.2012>
- Jackson, W. F. (2012). Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension*, 35(1), 173–178. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.1.173>
- Jamroz-Wisniewska, A., Gertler, A., Solomon, G., Wood, M. E., Whiteman, M., & Beltowski, J. (2014). Leptin-induced endothelium-dependent vasorelaxation of peripheral arteries in lean and obese rats: Role of nitric oxide and hydrogen sulfide. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086744>
- Jensen, P. E. (1996). Calphostin C-sensitive enhancements of force by lysophosphatidylinositol and diacylglycerols in mesenteric arteries from the rat. *British Journal of Pharmacology*, 119(1), 15–22. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15671.x>
- Jeong, S. O., Pae, H. O., Oh, G. S., Jeong, G. S., Lee, B. S., Lee, S., ... Chung, H. T. (2006). Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1 β -induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(3), 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.002>
- Ji, Y., Pang, Q. feng, Xu, G., Wang, L., Wang, J. ke, & Zeng, Y. ming. (2008). Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology*.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.044>

- Jiao, Y., & Yang, Q. (2015). Downregulation of natriuretic peptide clearance receptor mRNA in vascular smooth muscle cells by angiotensin II. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 29(3), 260–268. <https://doi.org/10.1111/fcp.12111>
- Juhaszova, M., Shimizu, H., Borin, M. L., Yip, R. K., Santiago, E. M., Lindenmayer, G. E., & Blaustein, M. P. (1996). Localization of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in vascular smooth muscle, and in neurons and astrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779, 318–335. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb44804.x>
- Kamiya, T., Nagaoka, T., Omae, T., Yoshioka, T., Ono, S., Tanano, I., & Yoshida, A. (2014). Role of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-sensitive mechanisms in sphingosine 1-phosphate-induced constriction of isolated porcine retinal arterioles invitro. *Experimental Eye Research*, 121, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.011>
- Kanagy, N. L., Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2017). Vascular biology of hydrogen sulfide. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(5), C537–C549. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2016>
- Kaneko, T., Amano, M., Maeda, A., Goto, H., Takahashi, K., Ito, M., & Kaibuchi, K. (2000). Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(1), 110–116. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2901>
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K., Harada, K., ... Sato, K. (1997). Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacological Reviews*, 49(2), 157–230. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228665>
- Kiss, E., Murányi, A., Csontos, C., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J., & Erdödi, F. (2002). Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochemical Journal*, 365(1), 79–87. <https://doi.org/10.1042/bj20011295>
- Kimura, H. (2002). Hydrogen Sulfide as a Neuromodulator Hideo Kimura *. *Molecular Neurobiology*, 26(1), 13–19. <https://doi.org/10.1385/MN:26:1:013>
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., ... Kaibuchi,

- K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273(5272), 245–248. <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.245>
- Kimura, Y., Goto, Y.-I., & Kimura, H. (2009). Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2282>
- King, A. L., Polhemus, D. J., Bhushan, S., Otsuka, H., Kondo, K., Nicholson, C. K., ... Lefer, D. J. (2014). Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 3182–3187. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321871111>
- Kiss, L., Deitch, E. A., & Szabó, C. (2008). Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. *Life Sciences*, 83(17–18), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.08.006>
- Kitamura, K., & Yamazaki, J. (2002). Chloride Channels and Their Functional Roles in Smooth Muscle Tone in the Vasculature. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 85(4), 351–357. <https://doi.org/10.1254/jjp.85.351>
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T. P., & Brautigan, D. L. (2000a). Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 9897–9900. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.9897>
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T. P., & Brautigan, D. L. (2000b). Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 9897–9900. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.9897>
- Kloesch, B., Steiner, G., Mayer, B., & Schmidt, K. (2016). Hydrogen sulfide inhibits endothelial nitric oxide formation and receptor ligand-mediated Ca²⁺ release in endothelial and smooth muscle cells. *Pharmacological Reports*, 68(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.05.026>

- Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.07.002>
- Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., ... Nakano, T. (2000). Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Letters*, 475(3), 197–200. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01654-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01654-9)
- Köylü H. (2016). *Klinik Anlatımlı Tıbbi Fizyoloji* (2. Baskı). İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri.
- Kulkarni-Chitnis, M., Njie-Mbye, Y. F., Mitchell, L., Robinson, J., Whiteman, M., Wood, M. E., ... Ohia, S. E. (2015). Inhibitory action of novel hydrogen sulfide donors on bovine isolated posterior ciliary arteries. *Experimental Eye Research*, 134, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.04.001>
- Kulkarni, M., Njie-Mbye, Y. F., Okpobiri, I., Zhao, M., Opere, C. A., & Ohia, S. E. (2011). Endogenous production of hydrogen sulfide in isolated bovine eye. *Neurochemical Research*, 36(8), 1540–1545. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0482-6>
- Kuo, I. Y., & Ehrlich, B. E. (2015). Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006023>
- Kuo, M. M., Kim, D. H., Jandu, S., Bergman, Y., Tan, S., Wang, H., ... Santhanam, L. (2015). MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 310(1), H71–H79. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00574.2014>
- Kuo, S. M., Lea, T. C., & Stipanuk, M. H. (1983). Developmental pattern, tissue distribution, and subcellular distribution of cysteine: α -ketoglutarate aminotransferase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activities in the rat. *Neonatology*, 43(1–2), 23–32. <https://doi.org/10.1159/000241634>
- Kuriyama, S., Hall, M. O., Abrams, T. A., & Mittag, T. W. (1995). Isoproterenol inhibits rod outer segment phagocytosis by both cAMP- dependent and independent pathways. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 36(3),

730–736.

- Laggner, H., Hermann, M., Esterbauer, H., Muellner, M. K., Exner, M., Gmeiner, B. M. K., & Kapiotis, S. (2007). The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *Journal of Hypertension*, 25(10), 2100–2104. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32829b8fd0>
- Leung, T., Manser, E., Tan, L., & Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29051–29054. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29051>
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., ... Moore, P. K. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 117(18), 2351–2360. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467>
- Li, S., Ping, N. N., Cao, L., Mi, Y. N., & Cao, Y. X. (2015). H₂S induces vasoconstriction of rat cerebral arteries via cAMP/adenylyl cyclase pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289(3), 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.10.021>
- Liu, Y.-H., Lu, M., Hu, L.-F., Wong, P. T.-H., Webb, G. D., & Bian, J.-S. (2012). Hydrogen Sulfide in the Mammalian Cardiovascular System. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(1), 141–185. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4005>
- Liu, Y. H., Yan, C. D., & Bian, J. S. (2011). Hydrogen sulfide: A novel signaling molecule in the vascular system. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 58(6), 560–569. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31820eb7a1>
- Liu, Z., & Khalil, R. A. (2018). Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.012>
- Loh, Y. C., Tan, C. S., Ch'ng, Y. S., Yeap, Z. Q., Ng, C. H., & Yam, M. F. (2018). Overview of the microenvironment of vasculature in vascular tone regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19010120>

- Lu, M., & Adamis, A. P. (2002). Vascular endothelial growth factor gene regulation and action in diabetic retinopathy. *Ophthalmology Clinics of North America*, 15(1), 69–79. [https://doi.org/10.1016/S0896-1549\(01\)00010-4](https://doi.org/10.1016/S0896-1549(01)00010-4)
- Lu, M., Liu, Y.-H., Goh, H. S., Wang, J. J. X., Yong, Q.-C., Wang, R., & Bian, J.-S. (2010). Hydrogen Sulfide Inhibits Plasma Renin Activity. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(6), 993–1002. <https://doi.org/10.1681/asn.2009090949>
- Lubomirov, L. T., Gagov, H., Schroeter, M. M., Wiesner, R. J., & Franko, A. (2019). Augmented contractility of murine femoral arteries in a streptozotocin diabetes model is related to increased phosphorylation of MYPT1. *Physiological Reports*, 7(3). <https://doi.org/10.14814/phy2.13975>
- MacDonald, J. A., Eto, M., Borman, M. A., Brautigan, D. L., & Haystead, T. A. J. (2001). Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Letters*, 493(2–3), 91–94. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02277-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02277-3)
- Maenhaut, N., Boussery, K., Delaey, C., & Van de Voorde, J. (2007). Control of retinal arterial tone by a paracrine retinal relaxing factor. *Microcirculation*, 14(1), 39–48. <https://doi.org/10.1080/10739680601072131>
- Marín, J., Encabo, A., Briones, A., García-Cohen, E. C., & Alonso, M. J. (1999). Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: Calcium pumps. *Life Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00393-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00393-2)
- Markand, S., Tawfik, A., Ha, Y., Gnana-Prakasam, J., Sonne, S., Ganapathy, V., ... Smith, S. B. (2013). Cystathionine beta synthase expression in mouse retina. *Current Eye Research*, 38(5), 597–604. <https://doi.org/10.3109/02713683.2013.774024>
- Martelli, A., Testai, L., Breschi, M. C., Lawson, K., McKay, N. G., Miceli, F., ... Calderone, V. (2013). Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacological Research*, 70(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.12.005>
- Mathai, J. C., Missner, A., Kugler, P., Saparov, S. M., Zeidel, M. L., Lee, J. K., & Pohl, P. (2009). No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39), 16633–16638.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902952106>
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., ... Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *The EMBO Journal*, 15(9), 2208–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641286> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC450144>
- Mendonça, M. C., Doi, S. Q., Glerum, S., & Sellitti, D. F. (2006). Increase of C-type natriuretic peptide expression by serum and platelet-derived growth factor-BB in human aortic smooth muscle cells is dependent on protein kinase C activation. *Endocrinology*, 147(9), 4169–4178. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0239>
- Miao, C. Y., & Li, Z. Y. (2012). The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01404.x>
- Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Yamada, M., & Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca²⁺ influx. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), 39379–39386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.298208>
- Mikami, Y., Shibuya, N., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2013). Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ -lyase at the steady-state low intracellular Ca²⁺ concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(2), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.010>
- Mills, R. D., Mita, M., & Walsh, M. P. (2015). A role for the Ca²⁺-dependent tyrosine kinase Pyk2 in tonic depolarization-induced vascular smooth muscle contraction. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9416-2>
- Ming Cui Gong, Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1992). Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21492–21498.

- Módis, K., Bos, E. M., Calzia, E., Van Goor, H., Coletta, C., Papapetropoulos, A., ... Szabo, C. (2014). Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II Pathophysiological and therapeutic aspects. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 2123–2146. <https://doi.org/10.1111/bph.12368>
- Módis, K., Coletta, C., Erdélyi, K., Papapetropoulos, A., & Szabo, C. (2013). Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *FASEB Journal*, 27(2), 601–611. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216507>
- Moore, P. K., & Whiteman, M. (Eds.). (2015). *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide* (Vol. 230). Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-18144-8>
- Mulvany, M. J., & Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*, 41(1), 19–26. <https://doi.org/10.1161/01.RES.41.1.19>
- Murányi, A., Zhang, R., Liu, F., Hirano, K., Ito, M., Epstein, H. F., & Hartshorne, D. J. (2001). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Letters*, 493(2–3), 80–84. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02283-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02283-9)
- Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K., ... Snyder, S. H. (2011). Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulphydrates potassium channels. *Circulation Research*, 109(11), 1259–1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240242>
- Nagao, M., Duenes, J. A., & Sarr, M. G. (2012). Role of Hydrogen Sulfide as a Gasotransmitter in Modulating Contractile Activity of Circular Muscle of Rat Jejunum. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 16(2), 334–343. <https://doi.org/10.1007/s11605-011-1734-0>
- Naik, J. S., Osmond, J. M., Walker, B. R., & Kanagy, N. L. (2016). Hydrogen sulfide-induced vasodilation mediated by endothelial TRPV4 channels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 311(6), H1437–H1444. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00465.2016>

- Nalli, A. D., Rajagopal, S., Mahavadi, S., Grider, J. R., & Murthy, K. S. (2015). Inhibition of RhoA-dependent pathway and contraction by endogenous hydrogen sulfide in rabbit gastric smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 308(6), C485–C495. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00280.2014>
- Nalli, A. D., Wang, H., Bhattacharya, S., Blakeney, B. A., & Murthy, K. S. (2017). Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway and smooth muscle contraction by hydrogen sulfide. *Pharmacology Research and Perspectives*, 5(5). <https://doi.org/10.1002/prp2.343>
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J., & Lederer, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*, 270(5236), 633–637. <https://doi.org/10.1126/science.270.5236.633>
- Niir, N., & Ikebe, M. (2001). Zipper-interacting Protein Kinase Induces Ca²⁺-free Smooth Muscle Contraction via Myosin Light Chain Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29567–29574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102753200>
- Njie-Mbye, Y. F., Bongmba, O. Y. N., Onyema, C. C., Chitnis, A., Kulkarni, M., Opere, C. A., ... Ohia, S. E. (2010). Effect of hydrogen sulfide on cyclic AMP production in isolated bovine and porcine neural retinae. *Neurochemical Research*, 35(3), 487–494. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0085-7>
- Njie-Mbye, Y. F., Kulkarni, M., Opere, C. A., & Ohia, S. E. (2012). Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 98(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.03.001>
- Opere, C. A., Monjok, E. M., Kulkarni, K. H., Njie, Y. F., & Ohia, S. E. (2009). Regulation of [3H] d-aspartate release from mammalian isolated retinae by hydrogen sulfide. *Neurochemical Research*, 34(11), 1962–1968. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9984-x>
- Osborne, N. N., Ji, D., Majid, A. S. A., Fawcett, R. J., Sparatore, A., & Del Soldato, P. (2010). ACS67, a hydrogen sulfide-releasing derivative of latanoprost acid, attenuates retinal ischemia and oxidative stress to RGC-5 cells in culture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(1), 284–294.

<https://doi.org/10.1167/iov.09-3999>

- Ottolini, M., Hong, K., & Sonkusare, S. K. (2019). Calcium signals that determine vascular resistance. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, e1448. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1448>
- Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., ... Szabo, C. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21972–21977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908047106>
- Parmentier, J. H., Muthalif, M. M., Saeed, A. E., & Malik, K. U. (2001). Phospholipase D activation by norepinephrine is mediated by 12(S)-, 15(S)-, and 20-hydroxyeicosatetraenoic acids generated by stimulation of cytosolic phospholipase A2: Tyrosine phosphorylation of phospholipase D 2 in response to norepinephrine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15704–15711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011473200>
- Persa, C., Osmotherly, K., Chao-Wei Chen, K., Moon, S., & Lou, M. F. (2006). The distribution of cystathionine β -synthase (CBS) in the eye: Implication of the presence of a trans-sulfuration pathway for oxidative stress defense. *Experimental Eye Research*, 83(4), 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.04.001>
- Phosphorylation, L. C., Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., ... Ito, M. (1997). Rho-associated Kinase Directly Induces Smooth Muscle Contraction through Myosin Light Chain Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12257–12260.
- Ping, N. N., Li, S., Mi, Y. N., Cao, L., & Cao, Y. X. (2015). Hydrogen sulphide induces vasoconstriction of rat coronary artery via activation of Ca^{2+} -influx. *Acta Physiologica*, 214(1), 88–96. <https://doi.org/10.1111/apha.12475>
- Pong, W. W., Stouracova, R., Frank, N., Kraus, J. P., & Eldred, W. D. (2007). Comparative localization of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase in retina: Differences between amphibians and mammals. *Journal of Comparative Neurology*, 505(2), 158–165. <https://doi.org/10.1002/cne.21468>
- Powell, C. R., Dillon, K. M., & Matson, J. B. (2018). A review of hydrogen sulfide (H_2S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochemical*

- Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.014>
- Pozsgai, G., Hajna, Z., Bagoly, T., Boros, M., Kemény, Á., Materazzi, S., ... Pintér, E. (2012). The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *European Journal of Pharmacology*, 689(1–3), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.053>
- Qian, Y., & Matson, J. B. (2017). Gasotransmitter delivery via self-assembling peptides: Treating diseases with natural signaling gases. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.017>
- Ran, R., Du, L., Zhang, X., Chen, X., Fang, Y., Li, Y., & Tian, H. (2014). Elevated hydrogen sulfide levels in vitreous body and plasma in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Retina*, 34(10), 2003–2009. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000184>
- Rembold, C. M. (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.20.2.129>
- Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B., & Ridley, A. J. (2003). RhoE Binds to ROCK I and Inhibits Downstream Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 23(12), 4219–4229. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.12.4219-4229.2003>
- Schleifenbaum, J., Köhn, C., Voblova, N., Dubrovskaya, G., Zavarirskaya, O., Gloe, T., Crean, C.S., Luft, F.C., Huang, Y., Schubert, R., Gollasch, M. (2010). Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *Journal of Hypertension*, 28(9), 1875–1882. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833c20d5>.
- Shibuya, N., & Kimura, H. (2013). Production of hydrogen sulfide from D-cysteine and its therapeutic potential. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00087>
- Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., Ogasawara, Y., ... Kimura, H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2371>
- Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Nagahara, N., & Kimura, H. (2009). Vascular

- endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of Biochemistry*, 146(5), 623–626. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp111>
- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., & Kimura, H. (2008). 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(4), 703–714. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2253>
- Shin, H. M., Je, H. D., Gallant, C., Tao, T. C., Hartshorne, D. J., Ito, M., & Morgan, K. G. (2002). Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circulation Research*, 90(5), 546–553. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000012822.23273.EC>
- Si, Y. F., Wang, J., Guan, J., Zhou, L., Sheng, Y., & Zhao, J. (2013). Treatment with hydrogen sulfide alleviates streptozotocin-induced diabetic retinopathy in rats. *British Journal of Pharmacology*, 169(3), 619–631. <https://doi.org/10.1111/bph.12163>
- Simpson, R. C., & Freedland, R. A. (2018). Factors Affecting the Rate of Gluconeogenesis from L-Cysteine in the Perfused Rat Liver. *The Journal of Nutrition*, 106(9), 1272–1278. <https://doi.org/10.1093/jn/106.9.1272>
- Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E. S., & Bolotina, V. M. (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nature Cell Biology*, 6(2), 113–120. <https://doi.org/10.1038/ncb1089>
- Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/372231a0>
- Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (2000). Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00177.x>
- Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (2003). aka. *Physiological Reviews*, 83(4), 1325–1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2003>
- Standen, N. B., & Quayle, J. M. (1998). K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. In *Acta Physiologica Scandinavica* (Vol. 164, pp. 549–557). <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.00433.x>

- Streeter, E., Hart, J., & Badoer, E. (2012). An investigation of the mechanisms of hydrogen sulfide-induced vasorelaxation in rat middle cerebral arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(10), 991–1002. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0779-2>
- Sun, Q., Collins, R., Huang, S., Holmberg-Schiavone, L., Anand, G. S., Tan, C. H., ... Sivaraman, J. (2009). Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine γ -lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 3076–3085. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805459200>
- Sun N.L., Xi, Y., Yang, S.N., Ma, Z., Tang, C.S. (2007). Plasma hydrogen sulfide and homocysteine levels in hypertensive patients with different blood pressure levels and complications. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi [Chinese Journal of Cardiovascular Diseases]*, 35(12), 1145–1148.
- Szabo, C., Ransy, C., Módis, K., Andriamihaja, M., Murghes, B., Coletta, C., ... Bouillaud, F. (2014). Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 2099–2122. <https://doi.org/10.1111/bph.12369>
- Szczesny, B., Módis, K., Yanagi, K., Coletta, C., Le Trionnaire, S., Perry, A., ... Szabo, C. (2014). AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 41, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.04.008>
- Takir, S., Ortaköylü, G. Z., Toprak, A., & Uydeş-Doğan, B. S. (2015a). NaHS induces relaxation response in prostaglandin F₂ α precontracted bovine retinal arteries partially via Kv and Kir channels. *Experimental Eye Research*, 132, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.002>
- Takir, S., Uydeş-Doğan, B. S., & Özdemir, O. (2015b). Retina derived relaxation is mediated by Kir channels and the inhibition of Ca²⁺ sensitization in isolated bovine retinal arteries. *Experimental Eye Research*, 132, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.003>

- Takir, S., Sönmez Uydeş-Dogan, B., & Özdemir, O. (2011). Retina evokes biphasic relaxations in retinal artery unrelated to endothelium, KV, KATP, KCa channels and methyl palmitate. *Microvascular Research*, 81(3), 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2011.02.007>
- Takizawa, N., Koga, Y., & Ikebe, M. (2002). Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297(4), 773–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359219>
- Taniguchi, S., Kang, L., Kimura, T., & Niki, I. (2011). Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic β -cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress. *British Journal of Pharmacology*, 162(5), 1171–1178. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01119.x>
- Ti Deng, J., Van Lierop, J. E., Sutherland, C., & Walsh, M. P. (2001). Ca^{2+} -independent smooth muscle contraction: A novel function for integrin-linked kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16365–16373. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011634200>
- Toprak A., Uydes-Dogan B.S, Takir, S. (2017). Hidrojen Sülfürün Sığır Retinal Arterindeki Gevşetici Etkisinin Hücre İçi Kalsiyum Homeostazını Sağlayan Kalsiyum Pompalarıyla İlişkisi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, 17-20 Ekim 2017, Kongre Bildiri Kitapçığı, P056.
- Tóth, A., Kiss, E., Gergely, P., Walsh, M. P., Hartshorne, D. J., & Erdödi, F. (2000a). Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin. *FEBS Letters*, 484(2), 113–117. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02138-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02138-4)
- Tóth, A., Kiss, E., Gergely, P., Walsh, M. P., Hartshorne, D. J., & Erdödi, F. (2000b). Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin. *FEBS Letters*, 484(2), 113–117. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02138-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02138-4)
- Tykocki, N. R., Boerman, E. M., & Jackson, W. F. (2017). Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 485–581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>

- Umemura, K., & Kimura, H. (2007). Hydrogen Sulfide Enhances Reducing Activity in Neurons: Neurotrophic Role of H₂S in the Brain? . *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(11), 2035–2042. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1802>
- Vaandrager, A. B., & De Jonge, H. R. (1996). Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 157(1–2), 23–30. <https://doi.org/10.1007/BF00227877>
- Van Eyk, J. E., Kent Arrell, D., Foster, B. B., Strauss, J. D., Heinonen, T. Y. K., Furmaniak-Kazmierczak, E., ... Mak, A. S. (1998). Different molecular mechanisms for Rho family GTPase-dependent, Ca²⁺- independent contraction of smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 23433–23439. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.23433>
- Waldron, G. J., & Cole, W. C. (1999). Activation of vascular smooth muscle K⁺channels by endothelium-derived relaxing factors. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (Vol. 26, pp. 180–184). <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03006.x>
- Walker, R. L., Hume, J. R., & Horowitz, B. (2017). Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(5), C1184–C1192. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.5.c1184>
- Walsh, M. P., Horowitz, A., Clement-Chomienne, O., Andrea, J. E., & Allen, B. G. (1996). Protein kinase C mediation of Ca(2⁺)-independent contractions of vascular smooth muscle. *Biochem Cell Biol.*
- Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*, 92(2), 791–896. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2011> LK
<http://za2uf4ps7f.search.serialssolutions.com/?sid=EMBASE&issn=00319333&id=doi:10.1152%2Fphysrev.00017.2011&atitle>
- Wang, R., Szabo, C., Ichinose, F., Ahmed, A., Whiteman, M., & Papapetropoulos, A. (2015). The role of H₂S bioavailability in endothelial dysfunction. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.05.007>
- Wang, Y., Zheng, X. R., Riddick, N., Bryden, M., Baur, W., Zhang, X., & Surks, H. K.

- (2009). ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 104(4), 531–540. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.188524>
- Wang, Y., Zhou, H., Wu, B., Zhou, Q., Cui, D., & Wang, L. (2015). Protein Kinase C Isoforms Distinctly Regulate Propofol-induced Endothelium-dependent and Endothelium-independent Vasodilation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 66(3), 276–284. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000275>
- Ward, Y., Yap, S. F., Ravichandran, V., Matsumura, F., Ito, M., Spinelli, B., & Kelly, K. (2002). The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *Journal of Cell Biology*, 157(2), 291–302. <https://doi.org/10.1083/jcb.200111026>
- Webb, G. D., Lim, L. H., Oh, V. M. S., Yeo, S. B., Cheong, Y. P., Ali, M. Y., ... Moore, P. K. (2007). Contractile and Vasorelaxant Effects of Hydrogen Sulfide and Its Biosynthesis in the Human Internal Mammary Artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(2), 876–882. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.133538>
- Wibberley, A., Chen, Z., Hu, E., Hieble, J. P., & Westfall, T. D. (2003). Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 138(5), 757–766. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705109>
- Winther, A. K., Dalsgaard, T., Hedegaard, E. R., & Simonsen, U. (2015). Involvement of hydrogen sulfide in perivascular and hypoxia-induced inhibition of endothelin contraction in porcine retinal arterioles. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 50, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.07.002>
- Woodsome, T. P., Eto, M., Everett, A., Brautigan, D. L., & Kitazawa, T. (2001). Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca²⁺ sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *Journal of Physiology*, 535(2), 553–564. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00553.x>
- Wray, S., & Smith, R. D. (2004). Mechanisms of action of pH-induced effects on vascular smooth muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1), 163–172. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000041858.78005.d2>

- Wu, D., Hu, Q., Ma, F., & Zhu, Y. Z. (2016). Vasorelaxant Effect of a New Hydrogen Sulfide-Nitric Oxide Conjugated Donor in Isolated Rat Aortic Rings through cGMP Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7075682>
- Yan, H., Du, J., & Tang, C. (2004). The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.081>
- Yan, Y. Y., Wang, X. M., Jiang, Y., Chen, H., He, J. T., Mang, J., ... Xu, Z. X. (2015). The role of Rho/Rho-kinase pathway and the neuroprotective effects of fasudil in chronic cerebral ischemia. *Neural Regeneration Research*, 10(9), 1441–1449. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.165512>
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., ... Wang, R. (2008). H₂S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science*, 322(5901), 587–590. <https://doi.org/10.1126/science.1162667>
- Zaborska, K.E., Wareing, M., Austin, C. (2017). Comparisons between perivascular adipose tissue and the endothelium in their modulation of vascular tone. *British Journal of Pharmacology*, 174(20), 3388–3397. <https://doi.org/10.1111/bph.13648>
- Zhang, L., Wang, Y., Li, Y., Li, L., Xu, S., Feng, X., & Liu, S. (2018). Hydrogen sulfide (H₂S)-releasing compounds: Therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01066>
- Zhao, W., & Wang, R. (2002). H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(2), H474–H480. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00013.2002>
- Zhao, W., & Wang, R. (2015). H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(2), H474–H480. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00013.2002>
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., & Wang, R. (2001a). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO Journal*, 20(21), 6008–6016. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>

- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., & Wang, R. (2001b). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATPchannel opener. *EMBO Journal*, 20(21), 6008–6016. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>
- Zhou, Z., Von Wantoch Rekowski, M., Coletta, C., Szabo, C., Bucci, M., Cirino, G., ... Giannis, A. (2012). Thioglycine and l-thiovaline: Biologically active H₂S-donors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(8), 2675–2678. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.02.028>
- Zhu, Y. Z., Wang, Z. J., Ho, P., Loke, Y. Y., Zhu, Y. C., Huang, S. H., ... Moore, P. K. (2006). Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *Journal of Applied Physiology*, 102(1), 261–268. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00096.2006>

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HİDROJEN SÜLFÜRÜN SIĞIR RETİNAL ARTERİNİ GEVŞETİCİ
ETKİSİNDE KALSİYUM DUYARLILAŞTIRICI MEKANİZMALARIN
VE SENTEZİNDEN SORUMLU ENZİMLERİN İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%**2**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**1**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**0**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayça	Soyadı	Toprak
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	30.03.1990
Email	ecz.aycatoprak@yahoo.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üni. Eczacılık Fak. Farmakoloji ABD	2019
Lisans	İstanbul Üni. Eczacılık Fakültesi	2013
Lise	Adnan Menderes Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Staj		Modern Eczane	2 ay-2013
2. Staj		İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	1 ay-2012
3. Staj		PharmaVision İlaç Firması Kalite Kontrol Laboratuvarı	1 ay-2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	76,25	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	89,08		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar

- Takır S, Gürel-Gürevin E, **Toprak A**, Demirci-Tansel C, Uydeş-Doğan BS, 2016. The elevation of intraocular pressure is associated with apoptosis and increased immunoreactivity for nitric oxide synthase in rat retina whereas the effectiveness of retina derived relaxing factor is unaffected. *Experimental Eye Research*, 145, 401-411.
- Takır S, Ortaköylü GZ, **Toprak A**, Uydeş-Doğan BS, 2015. NaHS induces relaxation response in prostaglandin F 2 α precontracted bovine retinal arteries partially via Kv and Kir channels. *Experimental Eye Research*, 132, 190-197.

Tebliğler

- **Toprak A.**, Uydes-Doğan B.S, Takır, S. (2017). Hidrojen Sülfürün Retinal Arter Üzerindeki Vazodilatör Etkisinde Kalsiyum ve Kalsiyum Duyarlılaşması ile İlişkili Yolakların ve Sentezinden Sorumlu Başlıca Enzimlerin Düzeylerinin İncelenmesi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, 17-20 Ekim 2017, (Sözlü Sunum).
- **Toprak A.**, Uydeş-Doğan B.S, Takır, S. (2017). Hidrojen Sülfürün Sığır Retinal Arterindeki Gevşetici Etkisinin Hücre İçi Kalsiyum Homeostazını Sağlayan Kalsiyum Pompalarıyla İlişkisi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, 17-20 Ekim 2017, Kongre Bildiri Kitapçığı, P056.
- Takır, S., **Toprak A.**, Uydes-Dogan B.S. The role of a reduction in calcium sensitivity in H₂S induced relaxation in bovine retinal artery. 7th European Congress of Pharmacology, EPHAR, Istanbul, June 26-30, 2016.
- **Toprak A.**, Takır, S., Uydes-Dogan B.S. Retinal Gevşetici Faktörün Etkisinde Hidrojen Sülfürün Rolünün İncelenmesi. 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ankara, 7-10 Eylül 2015.
- Ortaköylü G.Z., **Toprak A.**, Takır, S., Uydes-Dogan B.S. NaHS induces a vasorelaxation response in isolated bovine retinal arteries independently from NO or cyclooxygenase pathway. 5th European Workshop on Lipid Mediators, Istanbul, October 23-24, 2014.

Sertifikalar

- 8eme colloque du Club des Belles Souris, DENEY HAYVANLARI, Illkirch, FRANCE, 08.11.2016.
- İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

Burslar ve Ödüller

- TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı 2015/2.Dönem bursiyeri
- TÜBİTAK 2211- Doktora Bursiyeri (Ekim 2013)

Özel İlgi Alanları (Hobileri)

- Seyahat etmek, Kitap okumak, Müzik dinlemek.