



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL AKUT KOLESİTİT MODELİ OLUŞTURULMUŞ
KOBAY İZOLE SAFRA KESESİ ŞERİTLERİNDE HİDROJEN
SÜLFÜRÜN GEVŞETİCİ ETKİLERİNİN MEKANİZMASININ
İNCELENMESİ**

Dr. Hakan ÇELİK

DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

SİVAS-2018



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL AKUT KOLESİSTİT MODELİ OLUŞTURULMUŞ
KOBAY İZOLE SAFRA KESESİ ŞERİTLERİNDE HİDROJEN
SÜLFÜRÜN GEVŞETİCİ ETKİLERİNİN MEKANİZMASININ
İNCELENMESİ**

Dr. Hakan ÇELİK

DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Şahin YILDIRIM

SİVAS-2018



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18/02/2015 tarih ve 2010 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.



KABUL VE ONAY



Üniversite : Cumhuriyet Üniversitesi
Enstitü : Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ana Bilim Dalı : Tıbbi Farmakoloji
Tezin Başlığı : Deneysel Akut Kolesistit Modeli Oluşturulmuş Kobay İzole Safra Kesesi Şeritlerinde Hidrojen Sülfürün Gevşetici Etkilerinin Mekanizmasının İncelenmesi
Savunma Tarihi : 07/08/2018
Danışmanı : Prof. Dr .Şahin YILDIRIM

Unvanı - Adı Soyadı

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. M.Kemal YILDIRIM

Üye : Prof. Dr. Şahin YILDIRIM

Üye : Prof. Dr. Tijen UTKAN

Üye : Prof. Dr. İhsan BAĞCIVAN

Üye : Doç. Dr. Semil Selcen GÖÇMEZ

Oy Birliği Oy Çokluğu

Dr. Hakan ÇELİK tarafından hazırlanan “ Deneysel Akut Kolesistit Modeli Oluşturulmuş Kobay İzole Safra Kesesi Şeritlerinde Hidrojen Sülfürün Gevşetici Etkilerinin Mekanizmasının İncelenmesi ” başlıklı tezi kabul edilmiştir.

.../.../....

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle yolumu aydılatan, emeğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen, akademik ahlaki kavramları öğreten Sayın Prof. Dr. Şahin YILDIRIM'a, Anabilim Dalımızın tüm öğretim üyelerine, labaratuvar çalışmalarında yol gösteren Doç. Dr. Ahmet ALTUN'a, bölüm asistanlarımıza, en içten duygularla teşekkür ediyorum.

Dr. Hakan ÇELİK
Sivas, 2018

ÖZET

DENEYSEL AKUT KOLESİSTİT MODELİ OLUŞTURULMUŞ KOBAY İZOLE SAFRA KESESİ ŞERİTLERİNDE HİDROJEN SÜLFÜRÜN GEVŞETİCİ ETKİLERİNİN MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Dr. Hakan ÇELİK

Doktora Tezi

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şahin YILDIRIM

Sivas 2018

Bu çalışmada deneysel akut kolesistit modeli oluşturulmuş kobaylardan izole edilen safra kesesi şeritlerinde karbakol ve elektriksel alan uyarısı aracılı kasılma yanıtları üzerinde hidrojen sülfürün gevşetici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Deneysel 18 adet 4-6 aylık 450-550 gram ağırlığında albino kobay safra kesesi şeritleri kullanılmıştır. Kontrol, sham ve deney grupları olarak ayrılan kobaylarda deney grubunda Parkman metodu ile akut kolesistit modeli oluşturulmuştur. İzole edilen safra kesesi şeritleri Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna yerleştirilmiş submaksimal konsantrasyonda karbakol ve elektrisel alan uyarısı aracılı ön kasılma yanıtları oluşturulduktan sonra hidrojen sülfür donörleri ile gevşeme yanıtları alınmıştır. Kontrol, sham ve deney grubunda konsantrasyona bağımlı olarak NaHS ile gevşeme yanıtları gösterilmiştir. Gevşeme yanıtı akut kolesistit oluşturulmuş dokularında daha fazla olarak gerçekleşmiştir. Gerçekleşen gevşeme yanıtlarının endojen hidrojen sülfür ve NO aracılı olup olmadığı da incelenmiştir. Hem karbakol hemde elektriksel alan uyarıcı kasılmalardan sonra elde edilen gevşeme yanıtları nitrikoksit aracılı olmayan gevşemeler olarak kaydedilmiştir. Endojen hidrojen sülfür üretiminin ise gevşeme yanıtlarını azalttığı gözlenmiştir. Elektriksel alan uyarıcı aracılı yanıtlarda ise hidrojen sülfür etkisinin konsantrasyona bağımlı olduğu gözlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda kasılma ve bazal tonus artışı tespit edilmiştir. Sonuç

olarak safra kesesinde hem normal hemde akut kolesistitinde hidrojen sülfür donörleri gevşetici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: hidrojen sülfür, safra kesesi, akut kolesistit



**INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF THE RELAXANT
EFFECTS OF HYDROGEN SULFIDE ON ISOLATED
GALLBLADDER STRIPS OBTAINED FROM GUINEA PIGS: AN
EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE CHOLECYSTITIS**

Dr. Hakan CELIK

PhD Thesis

Department of Medical Pharmacology

Advisor: Prof. Dr. Sahin YILDIRIM

Sivas 2018

In this study, it was aimed to investigate the relaxant effects of hydrogen sulfide (H₂S) on carbachol and electrical field stimulation-induced contractile responses in isolated gallbladder strips obtained from guinea pigs in an experimental model of acute cholecystitis. In the experiments, gallbladder muscle strips from a total number of 18, and 4-6-month-old albino guinea pigs weighing 450-550 grams were used. The guinea pigs were randomly divided into 3 groups: control, sham-operated and study group. In the study group, acute cholecystitis model was established by Parkman method. Isolated gallbladder strips were mounted in the organ bath containing Krebs' solution, and carbachol and electrical field stimulation-induced pre-contractile responses were generated with the submaximal concentrations followed by relaxation responses with donors of hydrogen sulfide (H₂S). In the control, sham-operated and study groups, relaxation responses with NaHS were shown to be depending on the concentration. The relaxation response was more pronounced in acute cholecystitis-induced tissues. Whether or not the resulting relaxation responses were mediated by endogenous hydrogen sulfide and NO has also been studied. Relaxation responses obtained after both carbachol and electrical field stimulation-induced contractions were recorded as non-nitric oxide (NO)-mediated relaxations. Endogenous hydrogen sulfide production inhibition has been observed to reduce relaxation responses. The effects of hydrogen sulfide on electrical field stimulation-induced responses was observed to be concentration-dependent. Contractions and increase in basal tone were detected at lower concentrations. As a

result, it has been found that donors of hydrogen sulphide had a relaxant effect in gallbladder inflammation during both normal and acute cholecystitis.

Keywords: Hydrogen sulfide, Gallbladder, Acute cholecystitis



İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
GRAFİKLER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Safra Kesesi Histoloji Ve Embriyolojisi	3
2.2. Safra Kesesi Anatomisi	3
2.3. Safra Kesesi Fizyolojisi.....	6
2.4. Safra Taşları.....	6
2.5. Akut Kolesistit	8
2.6. Akut Kolesisti Patofizyoloji.....	8
2.7. Akut Kolesisti Histopatoloji	8
2.8. Hidrojen Sülfürün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	9
2.9. Hidrojen Sülfürün Sentezi ve Metabolizması.....	9
2.9.1. Hidrojen Sülfürün Santral sinir sistemi üzerindeki Etkileri.....	11
2.9.2. Gastrointestinal Sistem ve Hidrojen Sülfür	12
2.9.3. Kardiyovasküler Sistem ve Hidrojen Sülfür	13
2.10. Safra Kesesinde Kasıcı ve Gevşetici Etki Gösteren Ajanlar	14
2.11. İnterlökinler.....	14

2.12. İnterlökin 1.....	14
2.13. İnterlökin 6.....	15
2.14. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α).....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. <i>İn Vitro</i> Çalışmalar.....	17
3.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması.....	21
3.3. İzole Organ Banyosu Protokolü.....	22
3.4. Elektriksel Alan Uyarısı Aracılı Kasılma Yanıtları Deney Protokolü.....	22
3.5. İzole Organ Banyosunda Gevşeme Yanıtlarının Tanımlanması.....	23
3.5.1. İzole Organ Banyosunda H ₂ S Gevşeme yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	23
3.5.2. İzole Organ Banyosunda NO bağımsız H ₂ S Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	24
3.6. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtların Tanımlaması:.....	25
3.7. EAU Aracılı NO Bağımsız Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi.....	26
3.8. Deneyde Kullanılan Solüsyon ve Gereçler.....	26
3.9. Dokuların Saklanması Ve Histopatolojik Olarak İncelenmesi.....	27
3.10. İstatiksel Analizler ve Verilerin Sunumu.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. İzole Organ Banyosunda Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	29
4.1.1. H ₂ S ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi.....	29
4.1.2. L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi.....	30
4.1.3. DL-PAG ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi.....	31
4.2. İzole Organ Banyosunda NO bağımsız H ₂ S Gevşeme yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	32

4.2.1. L-NAME varlığında H ₂ S ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi	32
4.2.2. L-NAME varlığında L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi	33
4.2.3. L-NAME varlığında DL-PAG Yanıtlarının İncelenmesi.....	34
4.3. İzole Organ Banyosunda CSE bağımsız H ₂ S Gevşeme yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	35
4.3.1. DL-PAG varlığında H ₂ S ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi	35
4.3.2. DL-PAG varlığında L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi	36
4.4.1. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi	37
4.4.1. EAU Aracılı Nörojenik Kasılmalara NaHS Etkisi	37
4.4.2 EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına L-Sistein Etkisi.....	38
4.4.3. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına DL-PAG Etkisi	39
4.4.4. EAU Aracılı NO Bağımsız Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi.....	40
4.4.4.1 L-NAME varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılmalara NaHS Yanıtları.....	40
4.4.4.2 L-NAME varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına	41
L-Sistein Etkisi	41
4.4.4.3 L-NAME Varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına DL-PAG Etkisi	42
4.4.4.4 DL-PAG Varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına NaHS Etkisi.....	43
4.4.4.5 DL-PAG Varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına L-Sistein Etkisi.....	44
5. Kontrol Ve Deney Grupları Safra Sesesi Dokularının Histolojisi.....	45
6. Biyokimyasal Belirteçler IL-1, IL-6, TNF-a Seviyeleri.....	46

6.1 IL-1 Seviyeleri	46
6.2 IL-6 Seviyeleri	48
6.3 TNF-a Seviyeleri.....	49
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
7. KAYNAKLAR	55
8. ÖZGEÇMİŞ	59



SİMGELER VE KISALTMALAR

ASA	: Asetil salisilik asid
ATP	: Adenozin-3-fosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum
CBS	: Sistatyonin beta sentaz
CSE	: Sistatyonin gama liyaz
dk	: Dakika
EAU	: Elektriksel alan uyarısı
NOs	: Nitrik Oksit Sentetaz
g	: Gram
H⁺	: Hidrojen iyonu
HS⁻	: Hidrojen sülfid iyonu
H₂S	: Hidrojen sülfür
Hz	: Hertz
I	: I hücreleri
i.m	: İntramusküler
K⁺	: Potasyum iyonu
K_{ATP}	: ATP bağımlı potasyum kanalı
K_{Ca}	: Kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı
KCl	: Potasyum klorür
K_v	: Voltaj bağımlı potasyum kanalı
L-NAME	: N-nitro-L-arjinin metil ester
M	: Molar
ms	: Milisaniye
mV	: Milivolt

μM	: Mikromolar
Na^+	: Sodyum iyonu
NaHS	: Sodyum hidrojen sülfid
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NSAİİ	: Steroid yapısında olmayan anti-inflamatuar ilaçlar
ODQ	: 1H-(1,2,4)-oksadiazol-(4,3-a) kuinoksalin-1
PAG	: D,L- proparjilglisin
s	: Saniye
S^{-2}	: Sülfid iyonu
sAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
sGMP	: Siklik Guanozin Mono Fosfat
SP	: Substans P
TEA	: Tetraetilamonyum
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
TTX	: Tetrodotoksin
V	: Volt
VİP	: Vazoaktif intestinal polipeptit

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 1. Safra kesesi.....	4
Şekil 2. Safra Kesesi ve Komşulukları.....	5
Şekil 3. Safra Kanal Birleşimleri.....	5
Şekil 4. Hidrojen Sülfür Üretim Yolakları.....	10
Şekil 5. L-Sistein Yolağı.....	11
Şekil 6. Kontrol grubundan elde edilmiş safra kesesi	18
Şekil 7. Eksize edilmiş Safra kesesi	19
Şekil 8. Strip hazırlanması	19
Şekil 9. Deney grubu akut kolesistit oluşmuş safra kesesi	21
Şekil 10. Kontrol grubu safra kesesi histolojisi.	45
Şekil 11. Çalışma grubu safra kesesi histopatolojisi.	46

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. 3×10^{-3} M NaHS Gevşetici Etkisi	30
Tablo 2. 3×10^{-3} M L-Sistein Gevşetici Etkisi	30
Tablo 3. D,L PAG Gevşetici Etkisi	31
Tablo 4. 3×10^{-3} L-NAME Varlığında NaHS Gevşetici Etkisi.....	32
Tablo 5. L-NAME Varlığında L-sistein Gevşetici Etkisi.....	33
Tablo 6. L-NAME Varlığında D,L PAG Gevşetici Etkisi.....	34
Tablo 7. D,L PAG Varlığında NaHS Gevşetici Etkisi	35
Tablo 8. D,L PAG varlığında L-Sistein Gevşetici Etkisi	36
Tablo 9. Guanetedin Ve İndometasin Varlığında EAU (16 Hz) Aracılı 3×10^{-3} NaHS Gevşetici Etkisi	37
Tablo 10. Guanetedin ve İndometasin Varlığında EAU Aracılı L-Sistein Gevşetici Etkisi.....	38
Tablo 11. Guanetedin Ve İndometasin Varlığında EAU Aracılı D,L PAG Gevşetici Etkisi.....	39
Tablo 12. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı.....	40
Tablo 13. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı L-Sistein 3×10^{-3} M Gevşetici Etkisi	42
Tablo 14. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı D,L PAG Gevşetici Etkisi	43
Tablo 15. Guanetedin, İndometasin, DL-PAG Varlığında EAU Aracılı NaHS Gevşetici Etkisi.....	43
Tablo 16. Guanetedin, İndometasin, DL-PAG Varlığında EAU Aracılı 3×10^{-3} M L-Sistein Gevşetici Etkisi	45

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. 3×10^{-3} M NaHS Gevşetici Etkisi	30
Grafik 2. 3×10^{-3} M L-Sistein Gevşetici Etkisi	30
Grafik 3. D,L PAG Gevşetici Etkisi.....	31
Grafik 4. 3×10^{-3} L-NAME Varlığında NaHS Gevşetici Etkisi	32
Grafik 5. L-NAME Varlığında L-sistein Gevşetici Etkisi	33
Grafik 6. L-NAME Varlığında D,L PAG Gevşetici Etkisi	34
Grafik 7. D,L PAG Varlığında NaHS Gevşetici Etkisi.....	35
Grafik 8. D,L PAG varlığında L-Sistein Gevşetici Etkisi.....	36
Grafik 9. Guanetedin Ve İndometasin Varlığında EAU (16 Hz) Aracılı NaHS Gevşetici Etkisi.....	37
Grafik 10. Guanetedin ve İndometasin Varlığında EAU Aracılı L-Sistein Gevşetici Etkisi.....	38
Grafik 11. Guanetedin Ve İndometasin Varlığında EAU Aracılı D,L PAG Gevşetici Etkisi.....	39
Grafik 12. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı	40
Grafik 13. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı L-Sistein 3×10^{-3} M Gevşetici Etkisi.....	42
Grafik 14. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı D,L PAG Gevşetici Etkisi	43
Grafik 15. Guanetedin, İndometasin, DL-PAG Varlığında EAU Aracılı NaHS Gevşetici Etkisi	43
Grafik 16. Guanetedin, İndometasin, DL-PAG Varlığında EAU Aracılı L-Sistein Gevşetici Etkisi.....	45
Grafik 17. IL-1 Seviyeleri	47
Grafik 18. IL-6 Seviyeleri	48

Grafik 19 TNF-a Seviyeleri49



1. GİRİŞ

Hidrojen sülfür çürük yumurta kokusunda, havadan ağır, renksiz, toksik bir gaz olarak bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda hidrojen sülfürün memeli dokularında varlığı keşfedilmiştir. Birçok dokuda düzenleyici olduğu ve önemli miktarda sentez edildiğinin saptanması araştırmaları arttırmıştır. Toksikiteye yol açmasının sebebinin mitokondrideki sitokrom oksidaz enzim inhibisyonu olduğu gösterilmiştir (Reiffenstein, Hulbert, & Roth, 1992).

Abe ve Kimura hidrojen sülfürün beyinde nöromodülatör etkisi olabileceğini göstermiştir(Abe & Kimura, 1996). Kardiyovasküler sistem, karaciğer, böbrek ve beyinde yüksek miktarda sentezlendiğini belirlenmiştir (Doeller et al., 2005).

Endojen hidrojen sülfür üretimi için gerekli substrat L-Sisteindir. Sentezini yapan enzimler sistatyonin beta sentaz (CBS), sistatyonin gama liyaz (CSE), 3-merkaptosülfür transferaz (3-MST) dir(Hosoki, Matsuki, & Kimura, 1997), (Kabil & Banerjee, 2014). Bu enzimler dokulara yaygın olarak dağılmıştır. CBS santral sinir sisteminde ağırlıklı bulunurken, CSE enzimi kardiyovasküler sistemde bulunmaktadır(Chen, Jhee, & Kruger, 2004), (Kabil & Banerjee, 2014). Bu enzimler piridoksal fosfatı koenzim olarak kullanmaktadır(Papapetropoulos, Whiteman, & Cirino, 2015).

Etkileri araştırıldığında terapotik potansiyeli olabileceği ileri sürülmüştür.Hidrojen sülfürün Non-steroid anti-inflamatuvar ilaç indüksiyonlu mukozal kan akımı azalmasını ve mukozal lökosit infiltrasyonu geri döndürdüğü gösterilmiştir(Fiorucci et al., 2005). Bu nedenle asetilsalisilik asit ile kombine hidrojen sülfür donörü kombine ilaç çalışmaları ilerleme safhasındadır. Yapılan çalışmalarda kobay ileumunda gevşetici etkisi tespit edilmiştir(Teague, Asiedu, & Moore, 2002). Mide fundusunda CBS ve CSE enzim varlığının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi sonrası gastrointestinal sistemde araştırmalar hız kazanmıştır(Linden et al., 2008). Bağırsaktaki bakterilerin ürettiği hidrojen sülfürün portal hipertansiyon etyolojisinde olabileceği öne sürülmüştür(Wang et al., 2014). Buna karşın kolonda bulunan rodanaz enziminin bakteriler tarafından üretilen hidrojen sülfürü indirgediği gösterilmiştir. Kolon patolojik hastalıklarında rodanaz enzim azlığının da belirlenmesi ile hidrojen

sülfürün çok yönlü etkileri olabileceği anlaşılmıştır(Picton, Eggo, Merrill, Langman, & Singh, 2002).

Kardiyovaküler sistem de sıçan torasik aortasında yapılan çalışmada gevşeme ortaya çıkarttığı gösterilmiştir(Sun, Tang, Jin, & Du, 2011). Damar düz kasında gevşeme mekanizması tam olarak aydınlatılmasına karşın gastrointestinal sistemde tam olarak açıklanamamıştır. Damar düz kasında K_{ATP} ve K_v kanalları üzerinden etkileri açıklanmıştır(W. Zhao, Zhang, Lu, & Wang, 2001), (Łowicka & Bełtowski, 2007).

Hidrojen sülfürün pre ve post sinaptik alanlarda GABA-B reseptörlerini upregüle ettiği gösterilmiştir. Bu gibi etkiler hidrojen sülfürün beyinde eksitasyon ve inhibisyon dengesinde rol oynayabileceğinin öne sürülmesine neden olmuştur(Han et al., 2005).

Birçok çalışmada hidrojen sülfürün etkilerinin çok yönlü olabileceği gösterildiğinden araştırmalarını makro düzeylerden hücresel düzeylere indirmiştir.

Akut kolesistit etyolojisinde staz önemli bir yer tutar. Bu çalışma hidrojen sülfürün düz kas gevşetici etkisi sayesinde akut kolesistit geri döndürülebilir mi? sorusunun cevabına ön ayak olmak için araştırmamızı planlandı.

Safra kesesinde CBS ve CSE enzim varlığı gösterilmiş ancak in vitro çalışmalarla etkileri tam olarak açıklanamamıştır(Zhang, Pan, Yang, Xiao, & Yu, 2013). Çalışmamızda kobay izole safra kesesi preparatlarında organ hidrojen sülfür donörlerinin normal ve patolojik dokulardaki etkilerinin araştırılmasını amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Safra Kesesi Histoloji Ve Embriyolojisi

Safra kesesi, karaciğeri ve pankreasın embriyolojik olarak gelişimi birliktelik arz eder. Ön barsak ventral tarafındaki divertikülden oluşmaktadır. Divertikülün kraniyal kısmından karaciğer, orta kısmından safra kesesi, kaudal kısmından pankreas meydana gelmektedir. Anatomik şekil olarak fetal hayatın 5. Haftasında normal anatomik şekillerini almış olurlar. Karaciğerden safra salınımı ise 12.haftanın son kısmında başlar ve duodenuma ulaşır(Frierson, 1989), (Toouli & Bhandari, 2007).

Safra kesesi içten dışa doğru;

- 1- Mukozal Tabaka
- 2- Lamina Propria
- 3- Muskuler Tabaka
- 4- Subseröz Tabaka
- 5- Seröz Tabaka

Mukozal tabaka yani lümen içi tek katlı yüksek silindirik epitel ve mikrovillus ile örtülüdür. Lamina propria damarlar, sinir lifleri, lenfatikler, gevşek bağ dokusunu içerir. Makrofajlar ve mast hücreleride bu tabakada bulunmaktadır. Muskuler tabakada ise longitudinal, oblik ve sirküler kas lifleri bir arada bulunur. Bu kas liflerinin bu şekilde olması sayesinde kontrakte olduğunda 3 boyutlu bir boşaltma hareketi ortaya çıkar. Lümen epiteli, subseröz tabaka ve muskuler tabaka arasında Rokitansky-Aschoff sinüsleri bulunur. Bu sinüsler inflamasyonlu dokularda yaklaşık olarak normal dokunun iki katı olarak bulunur. (Frierson, 1989)

2.2. Safra Kesesi Anatomisi

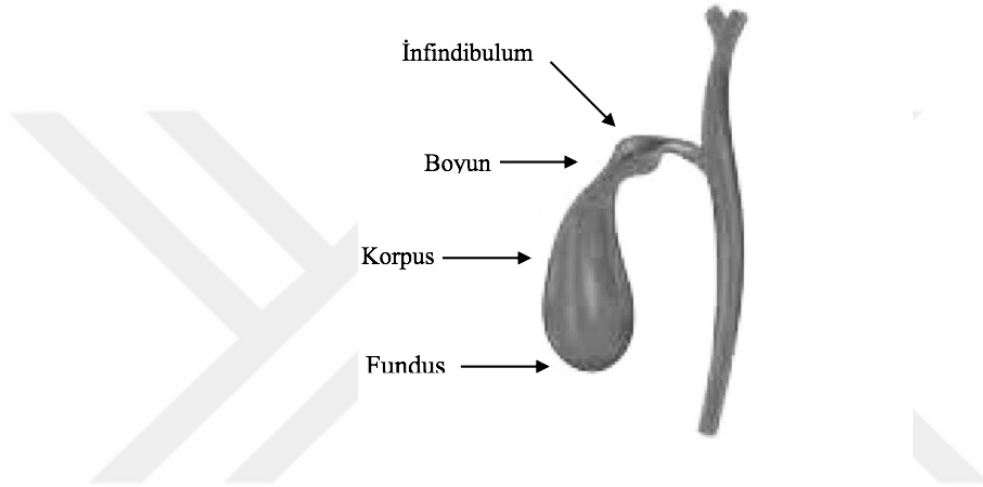
Safra kesesi karaciğerin alt yüzünde; sağ ve sol lobları arasında yer almaktadır. Safra kesesi 7 santimetre (cm) uzunluğunda genişliği ise 3 santimetredir(cm). Kontrakte ve genişlemiş olmayan hacmi 30-50 mililitredir(ml). Dört bölümden oluşmaktadır. Bunlar;

- 1- Fundus
- 2- Korpus

3- İnfundibulum

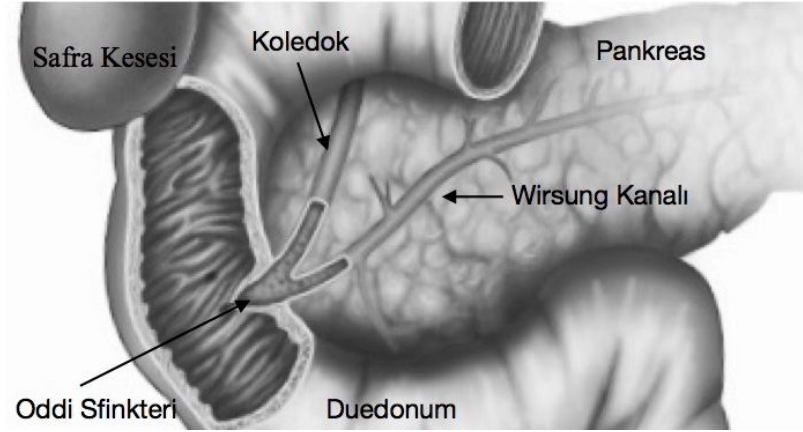
4- Boyun

Fundus Karaciğer tarafında olan kapalı olan ucudur. Düz kas yoğunluğu en fazla fundustadır. Korpus kısmı yani gövde en geçiş kısmıdır. Elastik lifleri yapısında bulundurur. Bu sebepten depolama faaliyeti için ana görev korpus kısmındadır. Korpus incelerek boyun kısmını oluşturur. Boyun kısmındaki kese, cep şekli infundulum veya Hartman cebi olarak adlandırılır (Frierson, 1989).

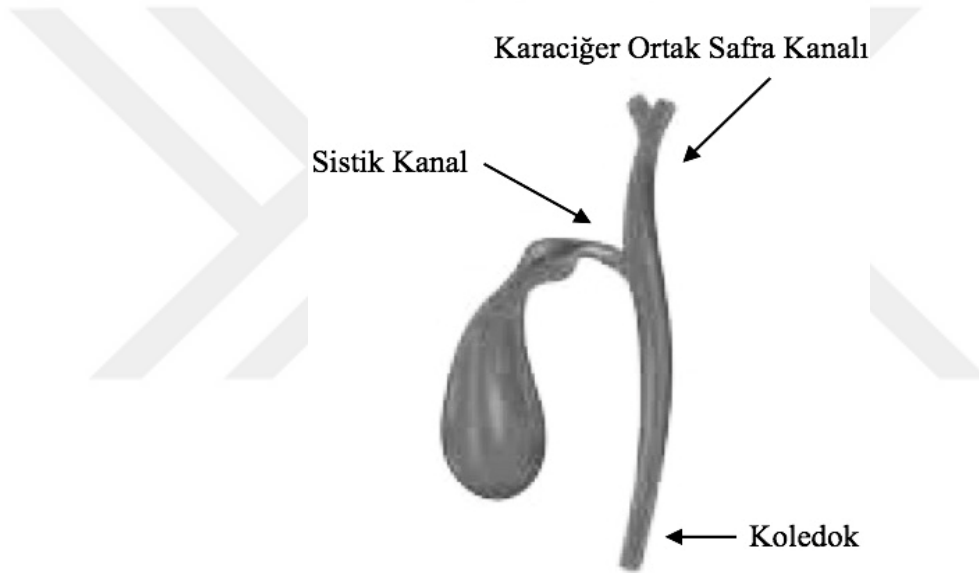


Şekil 1. Safra kesesi

Safra kesesinin boyun kısmı sistik kanal olarak devam eder. Karaciğerden gelen ortak hepatik kanalla birleşerek ortak safra kanalı yani koledok kanalını oluşturur. Koledok kanalı 8-10 cm uzunluğunda olup genişliği 0.4-0.8 cmdir. Koledok %70 oranla pankreatik kanalla birleşir ve Papilla Vateriye açılmaktadır. %25 oranında ise doğrudan duodonuma açılmaktadır. Koledokun duodonumla birleştiği yerde kanal etrafındaki sirküler kasların oluşturduğu Oddi sfinkterini (OS) bulunur (Songur, 2009)(Cotton, Elta, Carter, Pasricha, & Corazziari, 2016).



Şekil 2. Safra Kesesi ve Komşulukları



Şekil 3. Safra Kanal Birleşimleri

Arteryel beslenmesi Arteria hepatica propria'nın dalı sistik arterle olmaktadır. Bu arter ana beslendiği arter olduğundan iskemisi halinde safra kesesi patolojilere oldukça duyarlı hale gelir. Venöz dönüş sistik ven ile portal vene olmaktadır. Lenfatik drenajı paraaortik ve çölyak lenf nodlarına olmaktadır. (Songur, 2009)

Safra kesesi sempatik uyarımı çölyak plexus tarafından yapılır. Sempatik lifler ağrıyı iletir. Ağrı subkostal, epigastrik ve sağ skapular bölgeye yansır. Parasempatik lifler ise N. Vagus yoluyla gelirler. (Songur, 2009)

2.3. Safra Kesesi Fizyolojisi

Safra kesesinin görevi karaciğerde üretilen safrayı yoğunlaştırıp depolamak ve gerektiğinde duodenuma salgılamasıdır. Safranın içeriği; su (%80), safra asiti (%10), lesitin ve diğer fosfolipidler (%4-5), kolesterol (%1), konjuge bilirubin, elektrolitler ve bazı protein yapılarından oluşur. (Behar, 2013)

Safra hepatositlerde kolesterolden kolik asit ve kenodooksikolik asit olarak sentezlenir. Bunlar primer safra asitleridir. Sekonder safra asitleri ise barsakta bakteriler tarafından enzimatik modifikasyonla üretilir. Bunlar; deoksikolik, litokolik, ursodeoksikolik asitlerdir. Primer ve sekonder safra asitleri karaciğerce taurin ve glisin ile birleşerek yağ asitlerinin sindirimi için hazır hale gelirler. Hepatositten çıkan safra asitleri kanaliküller, duktuslar ve safra yolu ile safra kesesine taşınırlar. (Behar, 2013)

Günde ortalama bir erişkinde 250-1000 mL safra üretimi olmaktadır. Karaciğerden salınan safra ile safra kesesindeki safranın konsantrasyon olarak farkı vardır. Yaklaşık olarak 20 kat daha fazla yoğun halde safra kesesinde safra bulunmaktadır. Safra kesesinin hacmi 30-50 mL olduğundan gün içerisinde salgılanan safranın %90 suyu safra kesesi mukozasından geri emilir. Bu sayede safra hem yoğunlaştırılmış hemde asitleştirilmiş olur. Safra akımının organizasyonu safra kesesi kontraksiyonu, OS direnci ve karaciğer sekresyonuna bağlıdır (Behar, 2013).

Safranın salınımı için en önemli uyarı yemek sonrasında barsaklardan salgılanan kolesistokinindir (CCK). Kolesistokinin yağ ve aminoasitlerin barsaklara ulaştıktan sonra I hücrelerinden salınır. Kolesistokinin safra kesesini kontrakte ederken OS'u gevşeterek safranın duodenuma geçmesini sağlar. Bazı ilaçlar OS direncini azaltığından safra geçişine imkân tanımaktadır. Morfin OS direncini düşüren bilinen en iyi örneklerden biridir (Behar, 2013).

2.4. Safra Taşları

Safra taşı oluşumu safra kesesinin akut ve kronik iltihabi hastalıklarının oluşumunun en sık sebebidir. Kadınlarda erkeklere göre daha fazla görülmektedir. (Desrochers, 2013) Yapılan çalışmalarda ultrasonografi ile tespit edilen safra taşları erkeklerde %3-11 kadınlarda %11-15 oranında bulunmuştur. Yapılan çalışma 50 yaş altı bireyleri içerisine almıştır. Yaşla beraber safra taşlarının prevalansı artmıştır.

Erişkin otopsi çalışmalarında ise kadınlarda %17 erkeklerde %8 olarak görülmüştür(Sayek, 2004).

Safra taşı oluşumunda kolesterol, safra pigmentleri, kalsiyum diğer sebeplere göre daha fazla etkinliktedir. Karbonat, demir, fosfor, protein yapılar, karbonhidrat bileşikler, kendi üretimi olan mukus ve mukozal artık hücreler daha az sebebiyet verir.

Safra taşlarını %70 ini kolesterol taşları, bilürübin (pigment) %20 ve mikst taşlar %10 olarak sıralayabiliriz. Ancak sınıflamaya uymayan safra taşı vakaları bulunmaktadır.

Kolesterol taşları safra içerisindeki kolesterol yoğunluğu, safra akım stazı, bakteriyel sebepler, kalsiyum bileşikleri, paraziter sebepler taş oluşumuna sebep olur. Bazı risk faktörleri bulunan kişilerdeki kolesterol safra taşı yoğunluğu dikkat çekmiştir.

Bu risk faktörleri;

- 1- Doğum sayısı fazlalığı
- 2- Hiperlipidemi
- 3- Obezite
- 4- Vagotomi
- 5- Açık tenli kadın olma
- 6- Doğum kontrol hapı kullanımı

Pigment (bilürübin) taşları hemolitik hastalıklar, siroz, safra kesesi paraziter hastalıklarında sık görülür. Pigment taşları siyah ve kahverengi olarak ikiye ayrılmaktadır. Kahverengi pigment taşları paraziter durumlarda daha sıktır. Bu parazitler;

- 1- Clonorsis sinensis
- 2- Opisthorchis viverrini,
- 3- Askaris lumbricoides'dir.

Dolayısıyla parazitlerin sık görüldüğü Güneydoğu Asya gibi bölgelerde kahverengi pigment taşları sık görülür.

Mikst taşlar ise pigment ve kolesterol taşlarının birleşimi ile oluşurlar. Bu birleşimin oranı bölge ve ırka göre değişiklik gösterebilir (İ, 2004) (Özkan K, Özen N, 1996).

2.5. Akut Kolesistit

Safra kesesinin akut olarak iltihaplanmasına akut kolesistit denilmektedir. Akut kolesistit beyaz ırkta siyah ırka oranla, kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülür. Genellikle 4. Ve 8. Dekatlar arasında rastlanılır. Kolelityazisi olan hastaların ise %20 sinde akut kolesistit görülmüştür (Özkan K, Özen N, 1996).

Oluşan klinik tablo hafiften ağıra doğru gidebilir. Bu durum hafif bir enflamasyondan, ampiyem, gangrene kadar uzanan ağır bir klinik tabloya dönüşebilir. Daha çok komplikasyonları sebebiyle hayatı tehdit eder. Akut kolesistit vakalarının %95 inde kolelityazis eşlik eder ve bu akut taşlı kolesistit olarak adlandırılır. Geriye kalan %5 akut kolesistit vakasında taş yoktur. Akut taşsız kolesistit sebepleri ise enfeksiyon hastalıkları, çocukluk döneminde geçirilen ateşli hastalıklar, malign tümörler, diyabet, kollajen doku hastalıkları olarak sıralanabilir.(İ, 2004) (Özkan K, Özen N, 1996) (Y. Kimura et al., 2007).

2.6. Akut Kolesisti Patofizyoloji

Akut kolesistit vakalarının %95 inde taş eşlik etmektedir. Bu taşlar safra kesesinin sistik kanalındaki Hartman cebinde sıkışır. Bu sıkışma sonrası enflamatuvar durumlar gelişmeye başlar. Tıkanma ile birlikte safra kesesi gerilir, ödem, iskemi, nekroz ve ülser gelişir. Bu olaylardan hangisinin olacağı enflamasyon derecesine bağlıdır.

Tıkanma sonrası safra kesesinde safraanın sekresyon yeteneği geri emilme kapasitesinin önüne geçer. Bu durum sonrasında ise safra kesesi şişer gerilir ve hidrops gelişir. Ayrıca uzun süreli hidrops varlığı sistik kanal tıkanıklığını gösterir. Bu durum devam eder ise gangren, safra kesesinin perforasyonu, sepsis ve peritonite kadar gidebilir. (Y. Kimura et al., 2007)

2.7. Akut Kolesisti Histopatoloji

Mukozal ve subserozal tabakasında ödem sonrası hipervaskülerite gelişir. Submukoza tabakasında polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu başlar. Bu

değişiklikler akut kolesistit için karakteristik olmakla beraber tekrarlayan akut kolesistit vakalarından sonra mukozada düzleşme ve submukozada lenfosit varlığı kronik hale gelebilir (Jianjuni et al., 2012).

2.8. Hidrojen Sülfürün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

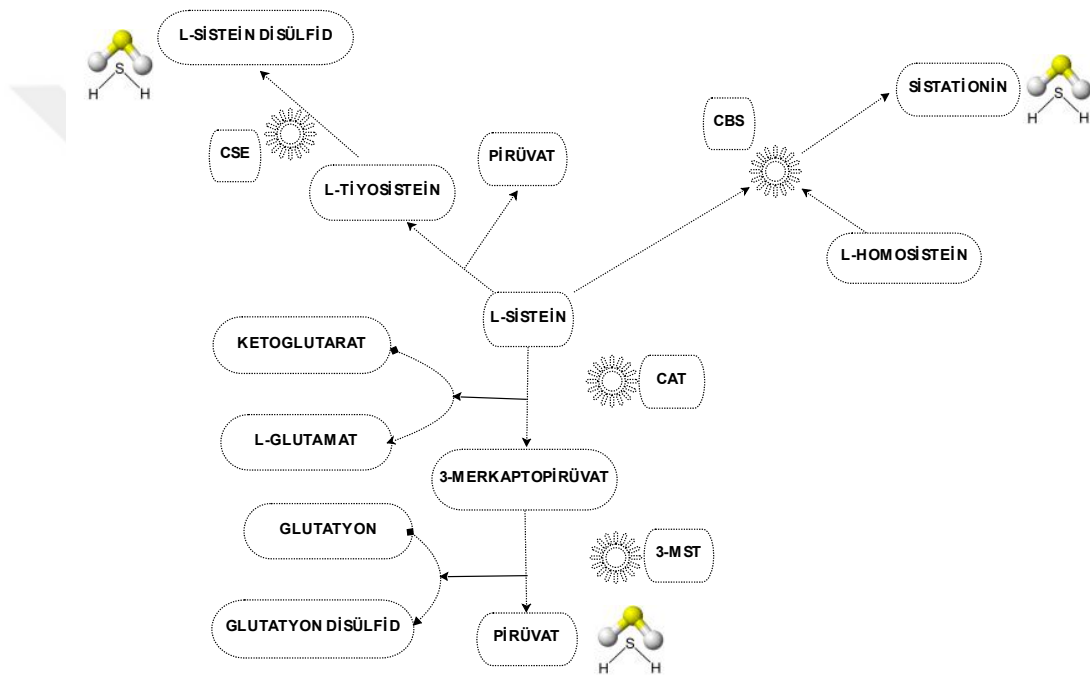
Hidrojen Sülfür toksik bir gaz olarak bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda memeli dokularında varlığı gösterilmiştir. Fizyolojik olarak bir etkisi ve önemi olup olmadığı bilinmemekteydi. Çürük yumurta kokusuna sahip, renksiz, suda çözünebilir, yanıcı karakterde olan bu gaz günümüzde biyolojik organizmalar için gazotransmitter adını almıştır(Papapetropoulos et al., 2015). İlk olarak fizyolojik etkiye sahip olabileceği santral sinir sistemi için öne sürülmüştür (Abe & Kimura, 1996). Bu etkisi Abe ve Kimura tarafından ortaya atılmıştır. (Abe & Kimura, 1996) Yapılan diğer araştırmalar sonrasında hidrojen sülfürün hücre membranından kolayca geçtiği, etkisi için resöptöre ihtiyaç duymadığı ve parakrin etkiye sahip olduğu gösterilmiştir(H. Kimura, 2014). Hidrojen sülfür vücudun fizyolojik kısımlarında üçte biri ayrışmamış, üçte ikisi H⁺ (hidrojen iyonu) ve HS⁻ (hidrojen sülfid) iyonu olarak ayrışmış halde bulunur. Bu şekilde ayrışmış olması ortama H₂S verecek donörlerin daha iyi anlaşılmasını sağlar. NaHS fizyolojik ortamda Na⁺ ve HS⁻ olarak ayrışmaktadır. Ayrışan HS⁻ ortamdaki H⁺ ile birleştiğinde H₂S ortaya çıkar. NaHS bu yüzden iyi bir hidrojen sülfür donörüdür. Hücre membranını kolayca geçmesi lipofilik olmasına bağlıdır ancak diğer gazlara göre geçişi daha azdır. Bunun da sebebi kısmen ayrışması olarak gösterilmektedir (Łowicka & Beltowski, 2007)(Qu, Lee, Bian, Low, & Wong, 2008).

2.9. Hidrojen Sülfürün Sentezi ve Metabolizması

Hidrojen sülfür solunum sistemi, kardiyovasküler sistem, sinir sistemi, gastrointestinal sistem, kas iskelet sistemi, üreme organlarında enzimatik olarak sentezlendiği ortaya çıkmıştır. Hidrojen sülfürün endojen sentezinde iki ana substrat L-Sistein ve Homosistein olarak bildirilmiştir. Sentez reaksiyonu yapabilen enzimler; sistation beta-sentaz (CBS), sistation-gama-liyaz (CSE) ve 3-merkaptopürivat sülfürtransferaz (3-MST)'dır(Kamoun, 2004).

Ancak 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz (3-MST) enzimi substrat olarak sistein'i kullanmaktadır. CBS ve CSE bu sentezi transsülfürasyon ile yapar (Stipanuk, 2004).

Ayrıca barsak florasında bakteriler tarafında oluşturulan H₂S barsaklarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Enterik sinir sisteminde özel bir sinyal molekülü olduğu düşünülmüştür(Wang et al., 2014)(Parks & Traber, 2000).



Şekil 4. Hidrojen Sülfür Üretim Yolakları

Systation Beta-Sentaz (CBS)

Bu enzim ilk defa beyinde keşfedilen bu enzimin daha sonra memelilerde karaciğer, ileum, pankreas, plasenta, böbrek gibi dokulardada ekprese edilmiştir. CBS enzimi substrat olarak homosistein ve sisteinden systationin oluşumuyla ilgili olduğu bildirilmiştir.(Giuffrè, 2018)

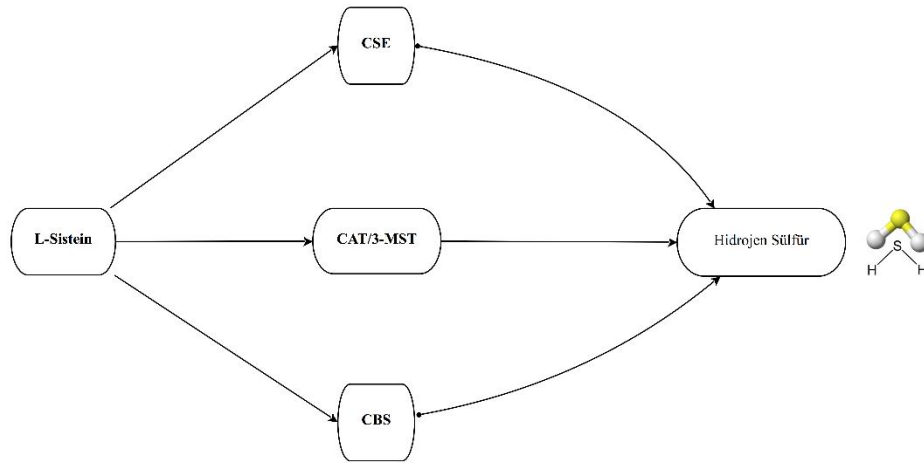


Sistein + Sistein -----CBS-----) Lantionin + H₂S (Kamoun, 2004)

CBS enziminin ko-faktörü olarak piridoksal 5' -fosfat (PLP) ve hem bileşeni olduğu belirlenmiştir. Hem bileşenin hücrede oksidatif stres sırasında H₂S oluşumunu artırabileceği saptanmıştır. (Kamoun, 2004)

Sistation-Gama-Liyaz (CSE)

CSE enzimi sistein ile reaksiyonunda H₂S, pirüvat, amonyak oluşumunu sağlar. Reaksiyon sonucu ortaya çıkan H₂S bir kısmı enzimatik bir kısmı ise enzimatik olmayan reaksiyon sonucu ortaya çıkmaktadır.CSE enzim ekspresyonu doku olarak CBS enzimiyle benzerdir(Kamoun, 2004).



Şekil 5. L-Sistein Yolağı

3-Merkaptopürivat Sülfürtransferaz (3-MST)

3-MST enzimi diğer iki enzim gibi PLP ye bağlı değil çinko olarak ko-faktör kullanır. Beyin, kalp, akciğerde ekspresyonu tespit edilmiştir(Doeller et al., 2005).

2.9.1. Hidrojen Sülfürün Santral sinir sistemi üzerindeki Etkileri

Hidrojen sülfürün fizyolojik etkileri ilk önce santral sinir sisteminde tanımlanmıştır. Hidrojen Sülfür nöronlarda NMDA resöptörlerini uyararak cAMP üretimini attırmaktadır. Eksojen hidrojen sülfür verilmesiyle rat serbellum ve

serebrum kültüründe cAMP miktarını arttırdığı bunun kanıtı olabilir(H. Kimura, 2000). Ayrıca hidrojen sülfür nöronları oksidatif stresten koruduğu gösterilmiştir (Kimura Y,2004). Hidrojen sülfür astrosit ve mikroglialarda anti-inflamtuvar etkiye sahiptir. Bu etkisi yapılan çalışmaya göre lipopolisakkaritle indüklenen inflamasyon eksojen hidrojen sülfür ile NO ve TNF salınımının azaltılarak inflamasyondan koruduğu gösterilmiştir. Hücre içindeki Ca^{++} nöron içerisinde ve nöronlar arasında sinyalizasyonda aktif rol oynar. Hidrojen sülfür hücre içi Ca^{++} miktarını arttırdığından Ca^{++} ile regüle edilen tüm olaylarda katkısı olabilir. Hidrojen sülfürün rat nöronlarında ölüm ve hücre içi Ca^{++} artışına neden olduğu görülmüştür. Bu etki Nifepidin ile kaldırılabilirdiği tespit edilmiş. Bu sebeple L-tipi Ca^{++} kanalları üzerinden etki edebileceği ortaya konmuştur. Posterior hipotalamusa enjekte edilen hidrojen sülfür donörü NaHS kan basıncını ratlarda düşürmüştür. Bu etki K_{ATP} kanal inhibitörleri ile kaybolmuştur. Hidrojen sülfürün bu etkisinin K^+ kanalları üzerinden yaptığı iddaa edilmiştir.(Lee et al., 2006) Ayrıca bu kanallar nöbet kontrolünde rol oynadığından hidrojen sülfürün nöroprotektif etkisi olabileceği öngörülmüştür. (Yamada, 2005) Klor kanallarını hidrojen sülfürün aktive ettiği de gösterilmiştir. (Kimura Y, 2006).

Ortaya çıkan bu etkilere bakıldığında santral sinir sisteminde hidrojen sülfürün anahtar rollere sahip olacağı anlaşılmıştır. Ancak deneylere yapılan bir eleştiri de fizyolojik değil bolus dozlarda hidrojen sülfür verilmesiyle ortaya çıkan etkilerdir.(Giuffrè, 2018)(Shefa, Kim, Jeong, & Jung, 2018)

2.9.2. Gastrointestinal Sistem ve Hidrojen Sülfür

Hidrojen sülfürün memelilerde keşfinden önce sindirim sisteminin bir ürünü olarak kabul ediliyordu.Daha sonra sindirim yerine bağırsaktaki bakteriler tarafından üretildiği bulundu.En sonunda gastrointestinal sistemde hidrojen sülfür ve enzimleri keşfedildi.Gastrik mukozada CBS ve CSE enzimi bulundu⁴İnsan kolonunda ise immünohistokimyasal olarak saptanmıştır.(Linden et al., 2008)Asetilsalisilik asit ve NSAİİ ilaçların hidrojen sülfür ve enzimlerinin ekspresyonunu azalttığı gösterildi.Bu etki hidrojen sülfür donörü ile geriye döndürülmüştür. NSAİİ ile indüklenen vasküler endotel lökosit infiltrasyonu ve mukozoya olan lökosit infiltrasyonunu NaHS ile

azalmıştır. Mukozal harabiyeti ve kan akımını eski haline getirdiği gösterilmiştir (Fiorucci et al., 2005)

Kobay gastrik antrum düzkasında NaHS ile yapılan çalışmada hidrojen sülfürün çift yönlü etkisi bulunmuştur. Düşük konsantrasyonlarda hidrojen sülfürün K_{ATP} kanalını direkt aktive ettiği ve buna bağlı olarak kalsiyum hücre girişinin azaldığı görüldü. Böylece spontan kontraksiyon amplitüdünü düşürdüğünü gösterilmiştir. Ayrıca K_V kanalının kısmen açılmasını inhibe ettiğinden hücre içi kalsiyum miktarını artırarak istirhaat gerimini artırmıştır. (P. Zhao et al., 2009)

Çeşitli hayvan türleri ileumunda yapılan çalışmalarda asetilkolin ile oluşturulan kasılma yanıtlarını hidrojen sülfür ile azaltıldığı gösterilmiştir. (Teague et al., 2002) Sıçan peritonuna verilen NaHS ile kolonda gevşeme görülmüştür. Mide motilitesi ve sekretuar fonksiyonları üzerinde etkisi de belirlenmiştir. (Szabó, 2007) Kolorektal distansiyona bağlı oluşan visseral ağrı duyusu doz bağımlı olarak iyileştirildiği gösterildi. Bazı çalışmalarda yine hiperaljeziyi belirgin azalttığı ve bu c-Fos gen ekspresyonunu artırarak oluşturduğu ilişkilendirilmiştir. (Distrutti et al., 2006)

Safra kanalı ligasyonu ile oluşturulan deneysel sirozda norepinefrinle oluşturulan vazokonstriksiyonu hidrojen sülfür gevşetici etki yapmıştır. Sağlıklı karaciğerde yapılan aynı çalışmada hidrojen sülfürün etkisi aynı olarak bulunmuştur. Yine safra kesesinde CBS ve CSE enzimlerinin ekspresyonu gösterilmiştir. (Zhang et al., 2013)

Kolon mukozasındaki bakteriler tarafından oluşturulan hidrojen sülfürün kolorektal kanserler ve ülseratif kolit gibi patolojilere sebep olabileceği düşünülmektedir. Enterositlerde bulunan rodonaz enzimi ile hidrojen sülfürün genotoksik etkisi kolondaki hücrelerde diğer hücrelere göre daha az olmaktadır. Kolorektal kanser hastalarının kolonlarında rodonaz enzim ekspresyonunun daha az olması bunu desteklemektedir. (Picton et al., 2002)

2.9.3. Kardiyovasküler Sistem ve Hidrojen Sülfür

Kardiyovasküler sistemde hidrojen sülfür üreten ana enzim CSE olarak belirlenmiştir. Bu enzim damar düzkasında ekprese edilmektedir. (Linden et al., 2008) Damar düz kasında güçlü bir gevşemeye sebep olan hidrojen sülfür

gazotransmitter olarak kabul edilmeye başlanmıştır.(Łowicka & Bełtowski, 2007) in vitro sıçan torasik oartası ile yapılan çalışmalarda hidrojen sülfür ve NaHS ile yapılan çalışmalarda gevşemeye sebep olduğu görülmüştür. Bu etki K_{ATP} kanallarını açarak oluşturduğu gösterilmiştir. İnvivo çalışmalarda ise sıçanda hipotansiyon geliştirmiştir. Ayrıca NO ile indüklenen damar gevşetici etkinin hidrojen sülfür ile daha da artırdığı gösterilmiştir. (W. Zhao et al., 2001) Bununla birlikte yüksek potasyumlu ortamda hidrojen sülfürün gevşetici etkisinin azaldığı gözlenmlenmiştir. Tetraetilamonyum (K kanal inh) ile hidrojen sülfürün yaptığı hipotansiyon ve gevşeme ortadan kalkmıştır. (W. Zhao et al., 2001) (P. Zhao et al., 2009) Yapılan çalışmalarda bu gevşetici etkinin NO ile bağımsız ancak birlikte potansiyelize olduğu kesinleşmiştir. (Hosoki et al., 1997)

2.10. Safra Kesesinde Kasıcı ve Gevşetici Etki Gösteren Ajanlar

Kasıcı etki yapan ajanlar: Asetilkolin (c-GMP artışına bağlı), a adrenerjik resöptör uyarıcıları, kolesitokinin, gastrin, histamin H_1 resöptör uyarıcıları, motilin, nörotensin, Substans P, Serotonin, Substans K, prostaglandinlerdir. Gevşetici etki yapanlar ise Adenozin, B- adrenerjik resöptör uyarıcılar, ATP, VIP, Histamin H_2 resöptör uyarıcılar, pankreatik polipeptidler, Sekretin, GABA A resöptör uyarıcıları'dır. (Behar, 2013) (İ, 2004) (Özkan K, Özen N, 1996) (Toouli & Bhandari, 2007)

2.11. İnterlökinler

1977'de IL-1'in keşfinden beri, yaklaşık 200.000'den fazla yayınlanmış makale IL'lere atıfta bulunmuştur. Spesifik reseptörlerine bağlanan ve lökositler arasındaki iletişimde rol oynayan salgılanmış proteinler, IL olarak adlandırılır. İnterlökinler hormona benzer ancak belli bir dokudan değil çok çeşitli hücrelerden salındıkları için hormon kabul edilmezler. İnterlökinler etkilerini parakrin veya otokrin olarak ortaya çıkartırlar. İnterlökinler peptid, glikoprotein yapıda olurlar. Çok düşük miktarda bile çok aktif uyarma güçlerine sahiptirler. Lokal yada sistemik inflamatuvar reaksiyonlardan sorumludurlar. (Akdis et al., 2011)

2.12. İnterlökin 1

İnterlökin-1 (IL-1) iki farklı proteinden oluşur. Bunlar IL-1 α ve IL-1 β 'dir. İkinci kromozom üzerinde iki ayrı gen tarafından oluşmaktadır. IL-1 α ve IL-1 β 'in

antijenik yapıları farklı olmalarına rağmen biyolojik aktiviteleri ve etkinlikleri aynıdır. İnterlökin-1 tüm hücrelerde sentezlenebildiği gibi makrofajlar, keratinositler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, dendritikhücreler, fibroblastlar ve nötrofillerde de belirgin olarak sentezlenir. İnterlökin-1 hücreler üzerine sitoprotektif özelliğe sahiptir. Bu özelliği kemik hücreleri üzerine daha belirgindir.IL-1 T hücrelerinden IL-2 salgılanmasını sağlar. Bu etkisi sayesinde hücre sayısınıda artırarak IL-2 miktarını artırır. IL-1 B lenfositleride uyararak immünglobülin sentezini ve hücre yüzeyindeki immünglobülin resöptör yoğunluğunu da artırmaktadır. IL-1 TNF ile birlikte hipotalamusa etki ederek organizmada ateş ortaya çıkartır. IL-1 hepastositlerden de akut faz reaktanları üretilmesini sağlar. Başka bir deneyimle inflamatuvar reaksiyonun en başında önemli roller üstlenir. Bu sayede inflatuvar yanıtın varlığı ve yokluğu için ölçümü faydalıdır. (Akdis et al., 2011) (Dinarello, 2009)

2.13. İnterlökin 6

İnterlökin 6 (IL-6) öncelikle T ve B lenfositler, monositler, fibroblastlar, keratinositler, endotelyal hücreler, astrositler, kemik iliği stromal hücreleri ve mezenkimal hücreler tarafından sentez edilmektedir.B lenfositlerden antikor yapılıp salverilmesi için ana faktörlerden biridir.Lenfositlerden IgG, IgM, IgA üreten plazma hücrelerine dönüşümünü artırır.İstirhaat durumunda T lenfositlerde bulunur.B lenfositlerde mevcut değildir.Buradan IL-6 etkisinin B lenfositlerin geç dönemlerinde etkili olduğunu göstermektedir.IL-6 inflamatuvar reaksiyonda plazma hücrelerinden Ig salgılanmasının tayininde kullanılabilir. (Akdis et al., 2011) (Gabay, 2006)

2.14. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

TNF- α ve TNF- β olmak üzere İki formu vardır. TNF- α başlıca makrofajlardan salınan şeklidir. Tümör nekroz faktör kaşektin olarak da bilinir. TNF- β lenfosit orjinlidir. Yapı olara aminoasit dizlim benzerliği düşüktür. Ancak reseptörleri ve etki mekanizmaları aynıdır. Aktive makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulur ve proinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılırlar. Önemli 3 etkiye sahiptirler.

Sistemik akut faz reaksiyonları: Aktive makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF- α akut faz proteinlerinin artışı, ateş oluşumu ve iştah kaybı

Endotelyal etkiler: Lökosit adezyonu, prokoagülan aktivite ve TAF aktivasyonu

Fibroblastik etkiler: Kollagen sentezi ve fibroblast proliferasyonu

Etkileri sebebiyle organizmada inflamatuvar reaksiyon tayininde ölçülebilir. (Sedger & McDermott, 2014) (Horiuchi, Mitoma, Harashima, Tsukamoto, & Shimoda, 2010)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyleerde 18 adet albino Guinea Pig kobaylar kullanıldı. Ortalama ağırlıkları 450-550 gr, erkek, 5.5-6 aylık hayvanlar kullanıldı. Hayvanlar Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nde barındırıldı. Deney hayvanları 20±0.5 °C oda sıcaklığında ve 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamda bulunduruldu. Çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'dan alınan izin çerçevesinde yürütülmüştür. (2 Mart 2017 65202830-050.04.04-32)

3.1. *In Vitro* Çalışmalar

Çalışmamızda hayvanlar Kontrol, Sham ve Deney grubu olarak 18 kobay 3'e ayrılmıştır. Her bir grupta 6 adet kobay bulunmaktadır.

Kontrol grubundaki hayvanlara preanestezik ksilazine (5 mg/kg, i.m) ardından anestezik ketamin (40 mg/kg, i.m) olarak yapıldı. 15 dakika beklenildikten sonra anestezi kontrolünün ardından biyomkimyasal belirteç için 3 cc kan alınıp kan muhafaza protokolüne göre saklandı. Kobay karın tüyleri traş edilerek antisepsi yapıldıktan sonra kobay sabitlendi. Laparotomi ile cilt, karın duvarı ve periton geçildikten sonra safra kesesi boyun kısmının 1 cm üzerinden eksize edildi. Eksize edilen safra kesesi safrasından ayrıldıktan sonra hazırlanmış olan Krebs çözeltisi (sırasıyla mM NaCl 113, KCl 4,7, CaCl₂ 2,56 , MgCl₂ 1.13, NaHCO₃ 25, NaHPO₄ 1.5, D-glukoz 2,8) içeren petri kabına alındı. Kobay yüksek doz fenobarbitalle sakrifiye edildi.

Petri kabında önce kese tek bir kesi ile düz hale getirilerek 10 X 2 mm olacak şekilde her bir kobaydan 4 adet safra şeriti elde edildi. Histoloji preparatları alkol solüsyonuna alındı. Şeritler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarında izole organ banyosuna yerleştirildi. Organ banyosuna konan Krebs çözeltisi 37 °C sıcaklıkta %95 O₂ %5 CO₂ ile havandırılmıştır. 15 dakikada bir Krebs çözeltisi değiştirilmiş ve organ banyosuna asılan şeritler 60 dakika dinlenmeye bırakılmıştır.



Şekil 6. Kontrol grubundan elde edilmiş safra kesesi



Şekil 7. Eksize edilmiş Safra kesesi



Şekil 8. Strip hazırlanması

Sham grubu hayvanlara preanestezik ksilazine (5 mg/kg i.m) ardından anestezik ketamin 40 mg/kg i.m olarak yapıldı.15 dakika beklenildikten sonra anestezi kontrolünün ardından biyokimyasal belirteç için 3 cc kan alınıp kan muhafaza protokolüne göre saklandı. Kobay karın tüyleri traş sonrasında antisepsi yapıldıktan sonra kobay sabitlendi. Laparotomi ardından hızla periton, karın duvarı ve cilt kapatıldıktan sonra hayvanın uyanması beklendi. Kobay kafesine tek olacak şekilde uyandıktan sonra bırakıldı. 48 saat sonra anestezi protokü tekrarlandıktan sonra antisepsi ve sabitleme sonrası laparotomi yapıldı. Safra kesesi boyun kısmının 1cm üzerinden eksize edildi. Safra sağılarak boşaltıldı. Safra kesesi Krebs çözeltili içeren petri kabına alındı. Petri kabında önce kese tek bir kesi ile düz hale getirilerek 10 X 2 mm olacak şekilde her bir kobaydan 4 adet safra şeriti elde edildi. Histoloji preparatı alkol solüsyonuna alındı. Şeritler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Labratuvarında organ banyosuna yerleştirildi. Organ banyosuna konulan Krebs çözeltili 37 °C sıcaklıkta %95 O₂ %5 CO₂ ile havandırılmıştır. 15 dakikada bir Krebs çözeltili değiştirilmiştir. Organ banyosuna asılan stripler 60 dakika dinlendirilmiştir.

Deney grubu deney hayvanları preanestezik ksilazine (5 mg/kg i.m) olarak yapıldı. 15-20 dakika bekleme süresinden sonra anestezik ketamin (40 mg/kg i.m) olarak yapıldı. 15 dakika beklenildikten sonra anestezi kontrolü yapıldı. Biyokimyasal belirteç için 3 cc kan alınıp kan muhafaza protokolüne göre

saklandı. Kobay karın tüyleri traş edildi. Sabitlendikten sonra antisepsi yapıldı. Sağ subkostal kesi ile cilt, karın duvarı ve periton geçildi. Parkman yöntemine göre safra kesesi Common Bile Duct Ligasyon ile safra kanalı boyun bölgesinden 4.0 ipek ile bağlandı(Parkman et al., 1999).Kobay periton, karın duvarı ve cilt kapatıldıktan sonra hayvanın uyanması beklendi. Kobay kafesine tek olacak şekilde uyandıktan sonra bırakıldı. 48 saat sonra anestezi protokü tekrarlanarak antisepsi ve sabitleme sonrası laparotomi yapıldı. Safra kesesi boyun kısmının 1cm üzerinden eksize edildi. Safra sağılarak boşaltıldı. Kolesistit safra kesesi Krebs çözeltilisi içeren petri kabına alındı. Kobay yüksek doz fenobarbitalle sakrifiye edildi. Petri kabında önce kese tek bir kesi ile düz hale getirilerek 10 X 2 mm olacak şekilde her bir kobaydan 4 adet safra şeriti elde edildi. Histoloji preparatı alkol solüsyonuna alındı. Stripler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarında organ banyosuna asıldı. Organ banyosu Krebs çözeltilisi 37 °C sıcaklıkta %95 O₂ %5 CO₂ ile havandırılmıştır. 15 dakikada bir Krebs çözeltilisi değiştirilmiştir. Organ banyosuna asılan şeritler 60 dakika dinlendirilmiştir.



Şekil 9. Deney grubunda deneysel akut kolesistit oluşmuş safra kesesi

3.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Kobaylardan alınan kan örnekleri serum ayıraçlı tüplere (serum separator tube: SST) alındı. +4 derecede sıcaklıkta taşıma kabıyla laboratuvarında soğuk santrifüj edildi. Santrifüj 5000 devirde 15 dakika süre ile yapıldı. Örneklerden plazma pipetle alınarak ependorfa alındı. Örnekler saklanmak üzere -80 derece dolaplara konuldu. Deneylerde YLbiont Guinea Pig Interleukin 1 β , IL-1 β ELISA Kit, Guinea pig Tumor necrosis factor α , TNF- α ELISA Kit, Guinea pig Interleukin 6, IL-6 ELISA Kit kullanıldı. ELİZA protokolü kit için gönderilen kılavuza göre yapıldı. Deney sonrası elisa testi labratuvarında bulunan ELİZA okuyucu fotometre ile okundu.

Kitlerin özellikleri Metod : sandviç, Duyarlı aralık : 2ng/L→600ng/L, Duyarlılık 1.56ng/L Ölçüm dalgaboyu : 450nm 'dir.

3.3. İzole Organ Banyosu Protokolü

Kobaylardan elde edilen şeritler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarında izole organ banyosuna yerleştirildi. Organ banyosu Krebs çözeltisi 37 °C sıcaklıkta %95 O₂ %5 CO₂ ile önceden havandırılmış ve 15 dakikada bir Krebs çözeltisi değiştirilmiştir. Organ banyosuna asılan dokular 1g ön gerim verilmiştir. Dinlenme süresi boyunca bozulan tonustan dolayı gerim 1 grama düzeltilmiştir. Organ banyosuna asılan şeritler 60 dakika dinlendirilmiştir. 10 ml hacimdeki organ banyosuna konulan safra kesesi şeritleri bir ucu organ askısına, bir ucu izometrik kasılmaları kayıt etmek için Grass izometrik kuvvet transdüserine (FT 03, Grass Instruments, Quincy, MA, ABD) bağlı olacak şekilde yerleştirilmiştir. İzometrik düz kas kasılmaları ve gevşemeleri transdüserler aracılığı ile Grass marka kayıt sisteminde (79 E, Grass Instruments, Quincy, MA, ABD) kayıt edilmiştir.

3.4. Elektriksel Alan Uyarısı Aracılı Kasılma Yanıtları Deney Protokolü

Kobaylardan elde edilen şeritler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarında izole organ banyosuna asıldı. Organ banyosu Krebs çözeltisi 37 °C sıcaklıkta %95 O₂ %5 CO₂ ile önceden havandırılmıştır. 15 dakikada bir Krebs çözeltisi değiştirilmiştir. Organ banyosuna asılan dokular 1g ön gerim verilmiştir. Organ banyosuna asılan şeritler 60 dakika dinlendirilmiştir.

10 ml hacimdeki organ banyosuna konulan safra kesesi şeritleri bir ucu organ askısına, bir ucu izometrik kasılmaları kayıt etmek için Grass izometrik kuvvet transdüserine (FT 03, Grass Instruments, Quincy, MA, ABD) bağlı olacak şekilde yerleştirilmiştir. İzometrik düz kas kasılmaları ve gevşemeleri transdüserler aracılığı ile Grass marka kayıt sisteminde (79 E, Grass Instruments, Quincy, MA, ABD) kayıt edilmiştir.

EAU aracılı kasılma yanıtları 120 s. aralıkla 10 s. süre ile 60 V, 1 ms. parametrelerinde ve 16 Hz de kasılma yanıtları alınmıştır.

EAU aracılı kasılma yanıtları, sempatik sinir sisteminin ve prostaglandinlerin etkisini ortadan kaldırmak için, sempatik sinir sonlanmalarından noradrenalin

saliverilmesini inhibe eden guanetidin (10^{-6} M) ve siklooksijenaz inhibitörü indometazin (10^{-5} M) varlığında alınmıştır. Guanetidin ve indometazin organ banyosuna EAU aracılı kasılma yanıtları elde edilmeden 20 dk. önce eklenmiştir.

3.5. İzole Organ Banyosunda Gevşeme Yanıtlarının Tanımlanması

Her bir deneyde kontrol, sham ve deney grubundan elde edilen safra kesesi şeritleri 10^{-6} M karbakol ile prekontrakte edilerek dokularda çalışılmıştır. Karbakol konsantrasyonu laboratuvarımızda yapılan daha önceki safra kesesi şerit deneylerinde hesaplanan submaksimal konsantrasyon olan 10^{-6} M karbakol ile yapılmıştır. Deney ortamına 20 dakika önceden L-NAME ve DL-PAG inhibitörler de eklenmiştir. Karbakolle kasılan safra kesesi şeritleri plato çizdikten sonra ortama H_2S donörü olan NaHS ($10^{-7} - 3.10^{-3}$ M) , L-sistein (endojen H_2S üretimi prekürsörü)(10^{-6} - 3.10^{-3} M) DL- proparjilglisin (PAG-CSE enzim inhibitörü) ($10^{-6} - 3 \times 10^{-3}$ M) eklenerek kasılma yanıtları üzerine etkileri incelendi.

3.5.1. İzole Organ Banyosunda H_2S Gevşeme yanıtlarının

Değerlendirilmesi

1. Karbakolle Kasılmış Safra Kesesi Şeritinin H_2S ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

Kontrol, sham ve deney gruplardan elde edilen safra kesesi şeritleri izole organ banyosunda 60 dk dinlendirilmiş 15 dakikada bir yıkanmıştır. Safra kesesi şeritleri 10^{-6} M karbakol ile kasılmıştır. Kasılmayı takiben plato çizen dokuya kümülatif olarak H_2S donörü olan NaHS ($10^{-7} - 3.10^{-3}$ M) verilmiştir.

2. Karbakolle Kasılmış Safra Kesesi Şeritinin L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

Kontrol, sham ve deney gruplardan elde edilen safra kesesi şeritleri izole organ banyosunda 60 dk dinlendirilmiş 15 dakikada bir yıkanmıştır. Safra kesesi şeritleri 10^{-6} M karbakol ile kasılmıştır. Kasılmayı takiben plato çizen dokuya kümülatif olarak L-sistein ($10^{-6} - 3.10^{-3}$ M) verilmiştir.

3. Karbakolle Kasılmış Safra Kesesi Şeritinin DL-PAG ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

Kontrol, sham ve deney gruplardan elde edilen safra kesesi şeritleri izole organ banyosunda 60 dk dinlendirilmiş 15 dakikada bir yıkanmıştır. Safra kesesi şeritleri 10^{-6} M karbakol ile kasılmıştır. Kasılmayı takiben plato çizen dokuya kümülatif olarak CBS enzim inhibitörü D,L PAG ($10^{-6} - 3.10^{-3}$ M) verilmiştir

3.5.2. İzole Organ Banyosunda NO bağımsız H₂S Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

1. Karbakolle Kasılmış Safra Kesesi Şeritinin Ortamda L-NAME varlığında DL-PAG Yanıtlarının İncelenmesi

Kontrol, sham ve deney gruplardan elde edilen safra kesesi şeritleri izole organ banyosunda 60 dk dinlendirilmiş 15 dakikada bir yıkanmıştır. Ortama 20 dakika öncesinden L-NAME konulmuştur. Safra kesesi şeritleri 10^{-6} M karbakol ile kasılmıştır. Kasılmayı takiben plato çizen dokuya kümülatif olarak DL-PAG ($10^{-6} - 3.10^{-3}$ M) verilmiştir

2. Karbakolle Kasılmış Safra Kesesi Şeritinin Ortamda L-NAME varlığında L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

Kontrol, sham ve deney gruplardan elde edilen safra kesesi şeritinin izole organ banyosunda 60 dk dinlendirilmiş 15 dakikada bir yıkanmıştır. Ortama 20 dakika öncesinden L-NAME konulmuştur. Safra kesesi şeritleri 10^{-6} M karbakol ile kasılmıştır. Bu Kasılmayı takiben plato çizen dokuya kümülatif olarak L-sistein ($10^{-6} - 3.10^{-3}$ M) verilmiştir

3. Karbakolle Kasılmış Safra Kesesi Şeritinin ortamda L-NAME varlığında H₂S ile Gevşeme Kasılma Yanıtlarının İncelenmesi

Kontrol, sham ve deney gruplardan elde edilen safra stripleri izole organ banyosunda 60 dk dinlendirilmiş 15 dakikada bir yıkanmıştır. Ortama 20 dakika öncesinden L-NAME konulmuştur. Safra kesesi şeritleri 10^{-6} M karbakol ile kasılmıştır. Kasılmayı takiben plato çizen dokuya kümülatif olarak NaHS ($10^{-7} - 3.10^{-3}$ M) verilmiştir

4. İzole Organ Banyosunda CBS bağımsız H₂S Gevşeme yanıtlarının Değerlendirilmesi

5. Karbakolle Kasılmış Safra Kesesi Şeritinin Ortamda DL-PAG varlığın da H₂S ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

Kontrol, sham ve deney gruplardan elde edilen safra kesesi şeritinin izole organ banyosunda 60 dk dinlendirilmiş 15 dakikada bir yıkanmıştır. Ortama 20 dakika öncesinden D,L-PAG konulmuştur. Safra kesesi şeritleri 10⁻⁶ M karbakol ile kasılmıştır. Kasılmayı takiben plato çizen dokuya kümülatif olarak NaHS (10⁻⁷ – 3.10⁻³ M) verilmiştir

6. Karbakolle Kasılmış Safra Kesesi Şeritinin Ortamda DL-PAG varlığın da L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi

Kontrol, sham ve deney gruplardan elde edilen safra kesesi şeritinin izole organ banyosunda 60 dk dinlendirilmiş 15 dakikada bir yıkanmıştır. Ortama 20 dakika öncesinden D,L-PAG konulmuştur. Safra kesesi şeritleri 10⁻⁶ M karbakol ile kasılmıştır. Kasılmayı takiben plato çizen dokuya kümülatif olarak L-sistein (10⁻⁶ – 3.10⁻³ M) verilmiştir

3.6. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtların Tanımlaması:

EAU aracılı kasılma yanıtları alındıktan sonra ortama farklı dokularda farklı agonist, antagonistler ve enzim inhibitörleri (guanetidin 10⁻⁶ M (noradrenalin salıverilmesinin inhiye eder); indometazin (siklooksijenaz inhibitörü) 10⁻⁵ M ; L-NAME, (nitrik oksit sentaz inhibitörü), 10⁻⁴ M) D,L- proparjilglisin (PAG-CSE enzim inhibitörü) 10⁻⁵ M) uygulanarak EAU ile oluşan yanıtlar tanımlandı.

1. Guanetidin, İndometazin, L-NAME, D,L-PAG'ın EAU Nörojenik Kasılma Yanıtları
2. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi

Safra kesesi striplerinde kontrol, sham ve deney grupların da guanetidin ve indometazin varlığında kontrol kasılma yanıtları edildi. Kasılma yanıtları stabilizeştikten sonra ortama kümülatif olarak H₂S donörü olan NaHS (10⁻⁷ – 3.10⁻³ M), L-sistein (endojen H₂S üretimi prekürsörü) (10⁻⁶-3.10⁻³ M) D,L- proparjilglisin (PAG-CSE enzim inhibitörü) (10⁻⁶ – 3x10⁻³ M) eklenerek EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine etkileri incelendi.

3.6.2.1 Ortamda Guanetedin ve İndometasin varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılmalar Üzerine NaHS Yanıtları

3.6.2.2 Ortamda Guanetedin ve İndometasin varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılmalar Üzerine L-Sistein Yanıtları

3.6.2.3 Ortamda Guanetedin ve İndometasin Varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılmalar Üzerine D,L PAG'ın Etkileri

3.7. EAU Aracılı NO Bağımsız Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi

Safra kesesi striplerinde kontrol, sham ve deney gruplarında guanetedin ve indometasin, L-NAME varlığında 16 Hz EAU ile kontrol kasılma yanıtları edildi. Kasılma yanıtları stabilize olduktan sonra ortama H₂S donörü olan NaHS ($10^{-7} - 3 \cdot 10^{-3}$ M), L-sistein (endojen H₂S üretimi prekürsörü) ($10^{-6} - 3 \cdot 10^{-3}$ M) D,L- proparjilglisin (PAG-CSE enzim inhibitörü) ($10^{-6} - 3 \cdot 10^{-3}$ M) eklenerek EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine etkileri incelendi.

3.1 Ortamda Guanetedin ve İndometasin, L-NAME varlığında NaHS EAU Aracılı Nörojenik Kasılmalar Üzerine NaHS Etkileri

3.2 Ortamda Guanetedin ve İndometasin, L-NAME varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılmalar Üzerine L-Sistein Etkileri

3.3 Ortamda Guanetedin ve İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılmalar Üzerine D,L PAG'ın Etkileri

3.8. Deneyde Kullanılan Solüsyon ve Gereçler

1. İzole Organ Banyosu Transducer (Grass Instruments, Quincy, MA, ABD)
2. İzole Organ Banyosu Kayıt Sistemi (Grass Instruments, Quincy, MA, ABD)
3. Elektriksel Alan Uyarısı Sinyal Cihazı (Grass Instruments, Quincy, MA, ABD)
4. YLbiont Guinea Pig Interleukin 1 β , IL-1 β ELISA Kit ,
5. YLbiont Guinea pig Tumor necrosis factor α ,
6. YLbiont TNF- α ELISA Kit, Guinea pig Interleukin 6, IL-6 ELISA Kit

7. NaHS – Cayman Chemical
8. İndometasin – Sigma Life Sciences
9. Guanetedin – Sigma Life Sciences
10. L-name – Sigma Life Sciences
11. L-sistein – Sigma Life Sciences
12. Karbakol – Sigma Life Sciences
13. Fenilefrin – Sigma Life Sciences
14. Atropin – Sigma Life Sciences
15. D-L PAG – Sigma Life Sciences
16. Dimetilsüfoksit- Merck Life Sciences
17. Distile Su
18. Krebs Solüsyonu-Safra Kesesi
19. Petri - Cerrahi Malzeme - 4.0 ipek suture (non-absorbant)
20. Anestezi İlaçları (Ketamin-Pfizer, Xylazine, Fenobarbital)
21. MAY heating Circulator
22. Kobay için üreticinin verdiği devam yemi
23. 18 adet Albino Erkek Guinea Pig

3.9. Dokuların Saklanması Ve Histopatolojik Olarak İncelenmesi

İzole organ banyosu için eksizye edilen safra kesesi örneklerinden elde edilen histolojik parçalar formaldehit (%10) solüsyonuna alınmıştır. Fiksasyon sonrası kesitler alındıktan sonra kesitler hazırlanarak hematoxilen-eozin ile boyanmıştır. Boyama işlemi sonrası kurumaya bırakılan preparatlar 4 X, 10 X ve 40 X büyütmede incelenmiştir. Akut kolesistit oluşan dokulardaki değişiklikler olan Ashoff-Rokitansky Sinüslerinin azalması, lenfositlerin mukozaya göçü, epitel kıvrımlarının düzleşmesi gibi özellikler incelenmiştir.

3.10. İstatiksel Analizler ve Verilerin Sunumu

Verilerin analizi konusunda; Tanımlayıcı istatistikler frekans, yüzde, ortalama, standart sapma değerleri ile sunulmuştur. Kontrol grubu, Sham grubu ve deney gruplarının gevşeme düzeylerinin farklı olup olmadığının incelenmesi amacı ile Friedman test analizi ve farklı olan grupların tespit edilmesi amacı ile ikili karşılaştırma testi uygulanmıştır. Çalışmada $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı $p > 0,05$ anlamlı değil olarak kabul edilmiştir. Analizler SPSS 22.0 paket programı ile yapılmıştır.

Grafikler GraphPad 7.0d programı ile çizilmiştir.

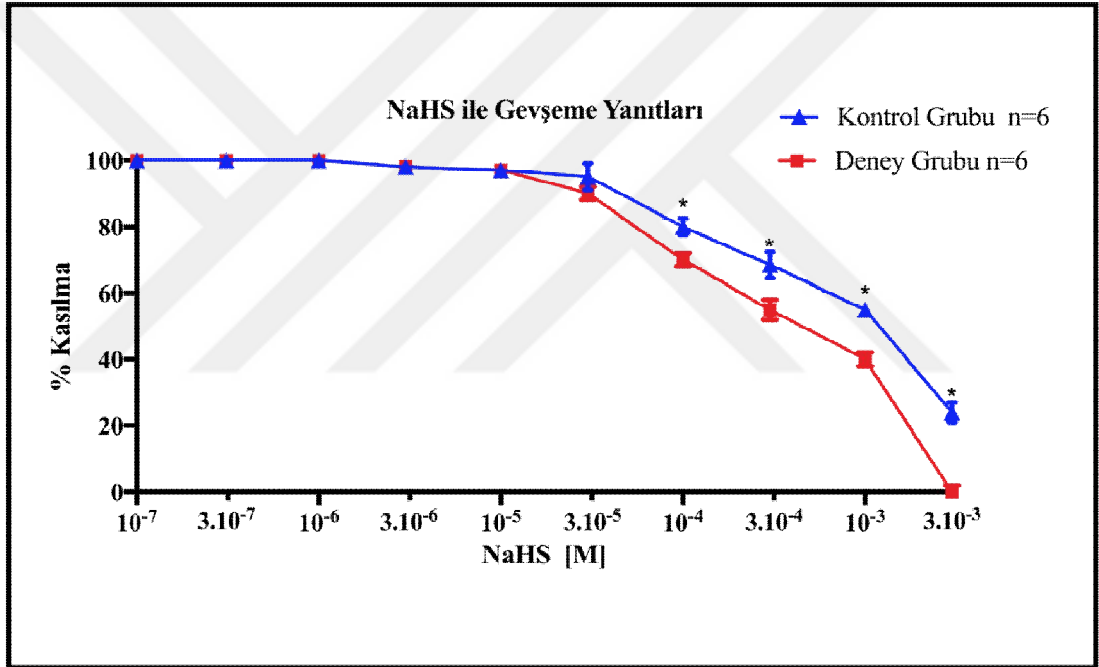


4. BULGULAR

4.1. İzole Organ Banyosunda Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Gevşeme yanıtları değerlendirilirken, Kontrol ve Sham Grupları karşılaştırıldığında hiçbir ajan uygulanmayan alt grubunda Kontrol ve Sham Grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Bu durum yapılan cerrahi işlemin gevşeme yanıtları üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermekte olup, bundan sonraki aşamada Deney Grubu, Kontrol Grubu ile karşılaştırılarak analizler yapılmıştır.

4.1.1. H₂S ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi



Grafik 1. Kontrol ve Deney grubunda 10⁻⁶ M Karbakol ile kasılan dokularda NaHS (10⁻⁷-3x10⁻³ M)'in gevşetici etkisi.

Gevşeme 10⁻⁶ M Karbakol oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

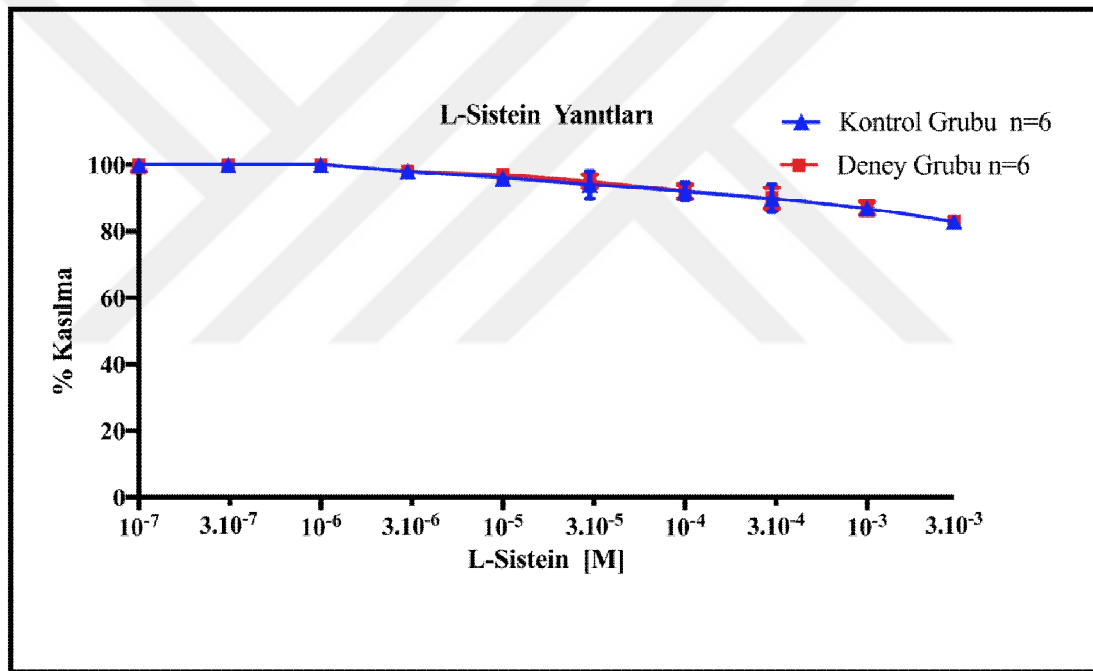
Tablo 1. 3×10^{-3} M NaHS Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol n=6	% 75 \pm 3
Sham n=6	%75.3 \pm 4
Deney n=6	%100 \pm 2 *

Deney grubundaki gevşemelerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu görülmüştür. (Grafik 1, Tablo 1) (* $p < 0,05$ n=6)

10^{-4} - 3×10^{-3} M NaHS konsantrasyonlarında gevşeme daha fazla olmuştur. (* $p < 0,05$ n=6)

4.1.2. L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi



Grafik 2. Kontrol ve Deney grubunda 10^{-6} M Karbakol ile kasılan dokularda L-sistein (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

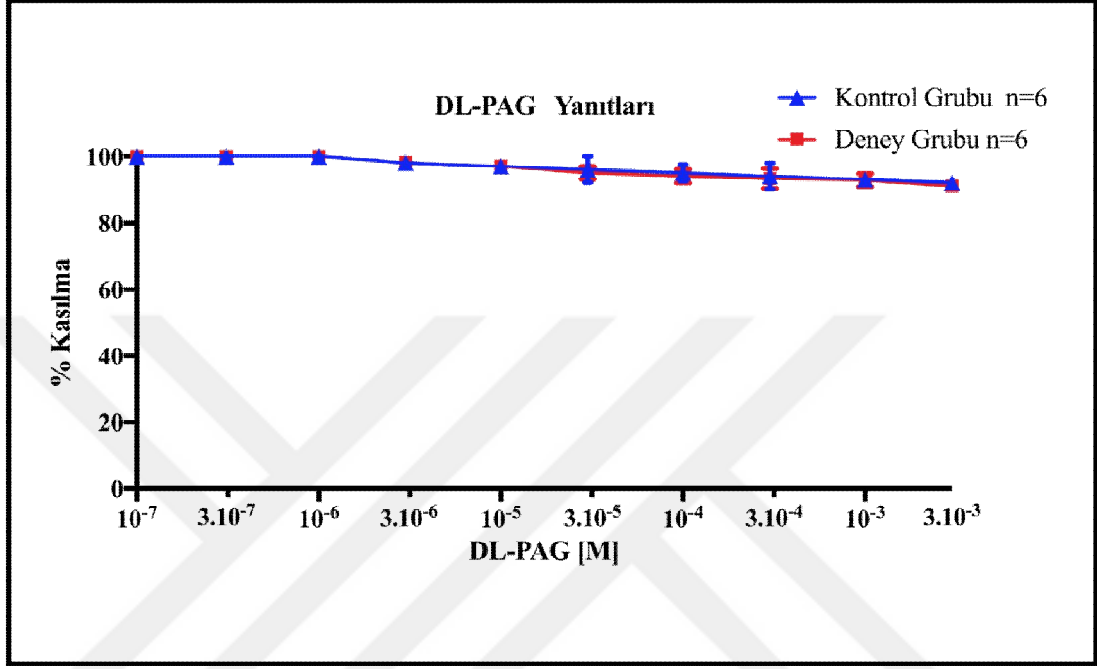
Gevşeme 10^{-6} M Karbakol oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 2. 3×10^{-3} M L-Sistein Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 17 \pm 1
Sham	%17 \pm 1.2
Deney	%17 \pm 0.8

Yapılan deneyde Kontrol ve deney grupları arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda aynı dozda %17 gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak aralarında fark yoktur. (Grafik 2, Tablo 2) $p > 0,05$, $n=6$

4.1.3. DL-PAG ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi



Grafik 3. Kontrol ve Deney grubunda 10^{-6} M Karkakol ile kasılan dokularda D,L PAG (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

Gevşeme 10^{-6} M Karbakol oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 3. D,L PAG Gevşetici Etkisi

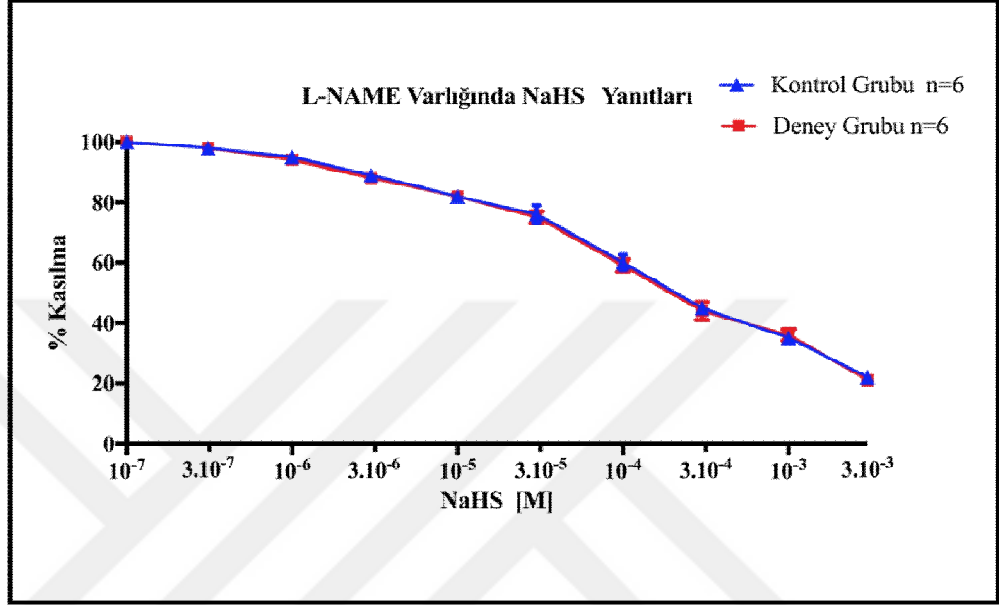
Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 8 ± 2.1
Sham	%8 ± 2.1
Deney	%8 ± 2

Yapılan deneyde Kontrol, sham ve deney grupları arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda aynı dozda %8 gevşeme olduğu görülmüştür.

Gevşeme yanıtları anlamında istatiksel olarak hiçbir konsantrasyonda kontrol ve deney grupları arasında bir fark gözlenememiştir. (Grafik 3, Tablo 3) $p > 0,05$, $n=6$

4.2. İzole Organ Banyosunda NO bağımsız H₂S Gevşeme yanıtlarının Değerlendirilmesi

4.2.1. L-NAME varlığında H₂S ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi



Grafik 4. Kontrol, Sham ve Deney grubunda L-NAME 10⁻⁶ Karkakol ile kasılan dokularda NaHS (10⁻⁷-3x10⁻³ M)'in gevşetici etkisi.

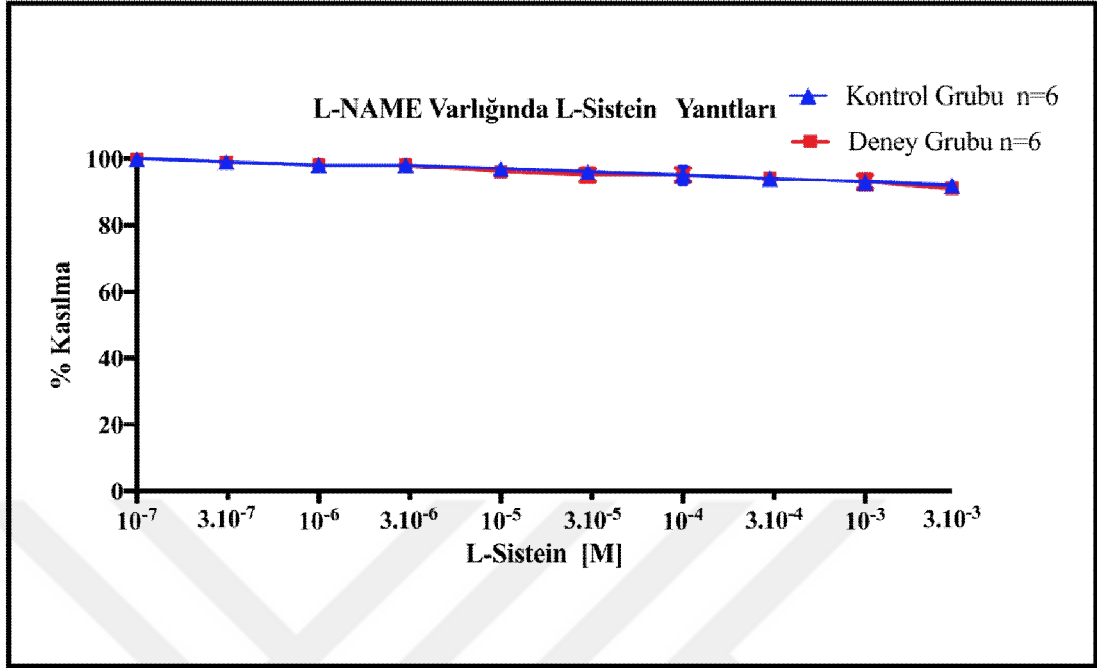
Gevşeme 10⁻⁶ Karkakol oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 4. 3x10⁻³ L-NAME Varlığında NaHS Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 77.1 ± 1.1
Sham	%78 ± 1.1
Deney	%79 ± 2.2

Tüm gruplarda ortalama %78.3 gevşeme görülmesine rağmen, kontrol, deney ve sham grubunun arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. (Grafik 4, Tablo 4) p >0,05, n=6

4.2.2. L-NAME varlığında L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi



Grafik 5. Kontrol, Sham ve Deney grubunda 10⁻⁶ Karkakol ile kasılan dokularda L-NAME L-Sistein (10⁻⁷-3x10⁻³ M)'in gevşetici etkisi.

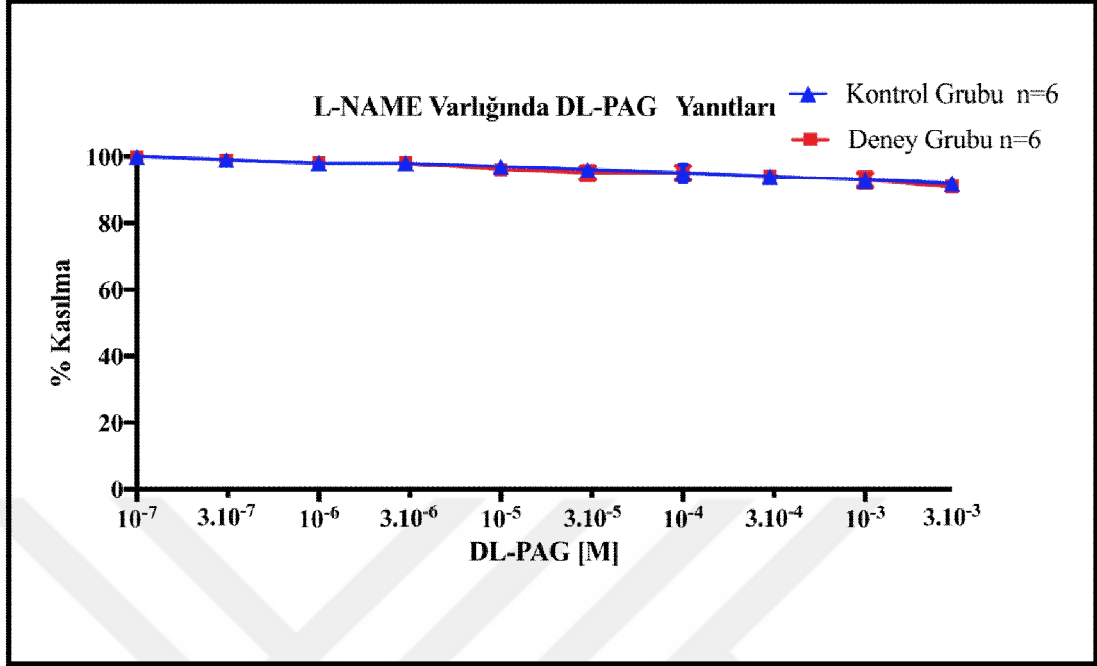
Gevşeme 10⁻⁶ Karbakol oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 5. L-NAME Varlığında L-sistein Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 9 ± 1.1
Sham	% 9 ± 2.1
Deney	% 9 ± 1.2

Yapılan deneyde Kontrol, deney ve sham grubunun arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda % 9 gevşeme görülmüştür. İstatiksel olarak fark yoktur. $p > 0.05$ $n=6$ (Grafik 5, Tablo 5)

4.2.3. L-NAME varlığında DL-PAG Yanıtlarının İncelenmesi



Grafik 6. Kontrol, Sham ve Deney grubunda 10⁻⁶ M Karkakol ile kasılan dokularda NaHS (10⁻⁷-3x10⁻³ M)'in gevşetici etkisi.

Gevşeme 10⁻⁶ M Karbakol oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

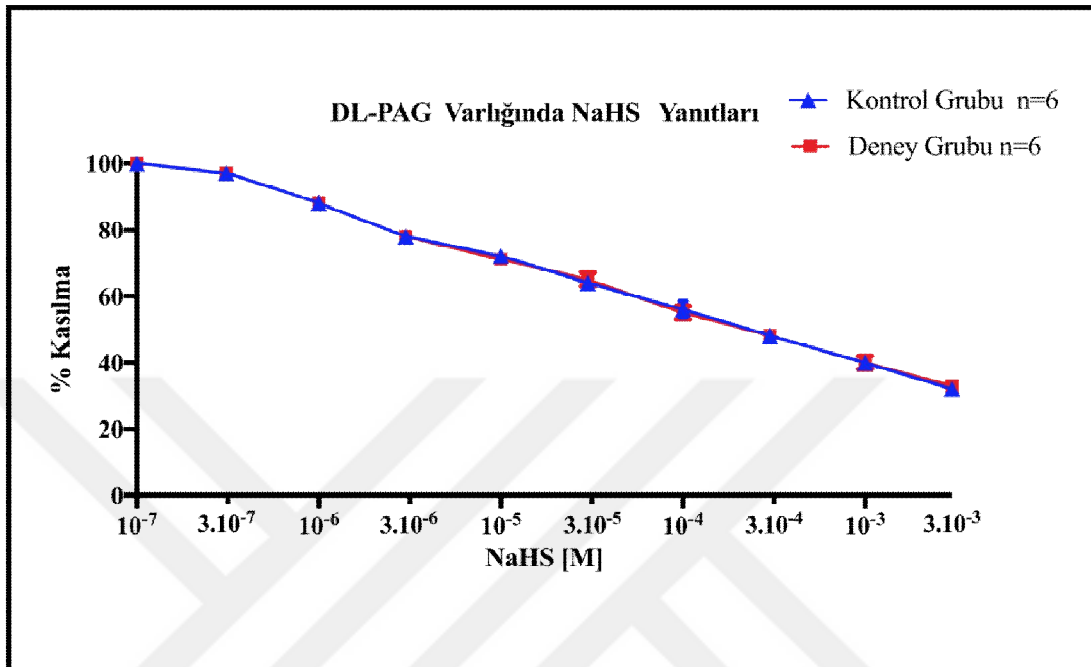
Tablo 6. L-NAME Varlığında D,L PAG Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 8 ± 1.1
Sham	% 7 ± 1
Deney	% 8 ± 2

Yapılan deneyde Kontrol, deney ve sham grubunun arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda %8 gevşeme görülmüştür. İstatiksel olarak fark yoktur. (Grafik 6, Tablo 6) p >0,05, n=6

4.3. İzole Organ Banyosunda CSE bağımsız H₂S Gevşeme yanıtlarının Değerlendirilmesi

4.3.1. DL-PAG varlığında H₂S ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi



Grafik 7. Kontrol, Sham ve Deney grubunda DL-PAG varlığında 10⁻⁶ M Karkakol ile kasılan dokularda NaHS (10⁻⁷-3x10⁻³ M)'in gevşetici etkisi.

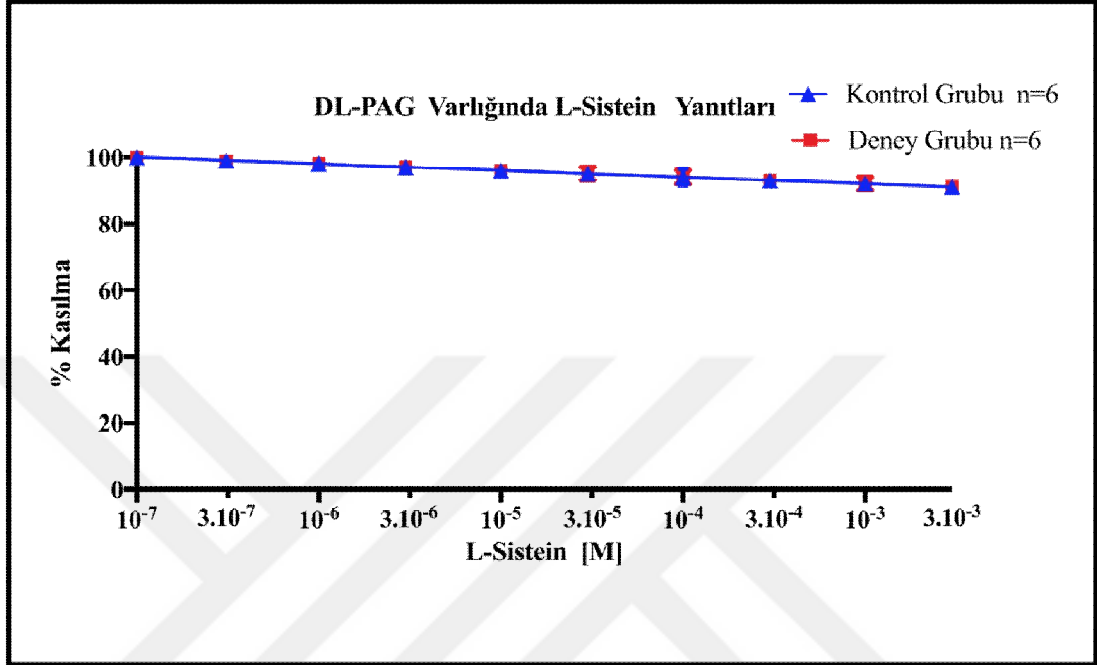
Gevşeme 10⁻⁶ M Karbakol oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 7. D,L PAG Varlığında NaHS Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma	
	D,L PAG Varlığında NaHS Gevşetici Etkisi	NaHS Gevşetici Etkisi
Kontrol	% 68 ± 1.1	% 75 ± 3.1*
Sham	% 68 ± 2.1	%75.3 ± 4.1*
Deney	% 68 ± 2.2	%100*

CBS enzim inhibitörü D,L PAG varlığında NaHS uygulanmasının meydana getirdiği gevşeme yanıtları kontrol, sham ve deney grupları arasında farklı değildi. Fakat bu gevşeme yanıtları sadece NaHS uygulaması ile karşılaştırıldığı her üç grupta da gevşeme yanıtlarının D,L PAG varlığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. İstatistiksel olarak DL-PAG varlığı gevşemeyi azaltmıştır.(Grafik 7, Grafik 1) *p<0,05, n=6

4.3.2. DL-PAG varlığında L-sistein ile Gevşeme Yanıtlarının İncelenmesi



Grafik 8. Kontrol ve Deney grubunda 10^{-6} Karkakol ile kasılan dokularda L-Sistein (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

Gevşeme 10^{-6} Karkakol oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 8. D,L PAG varlığında L-Sistein Gevşetici Etkisi

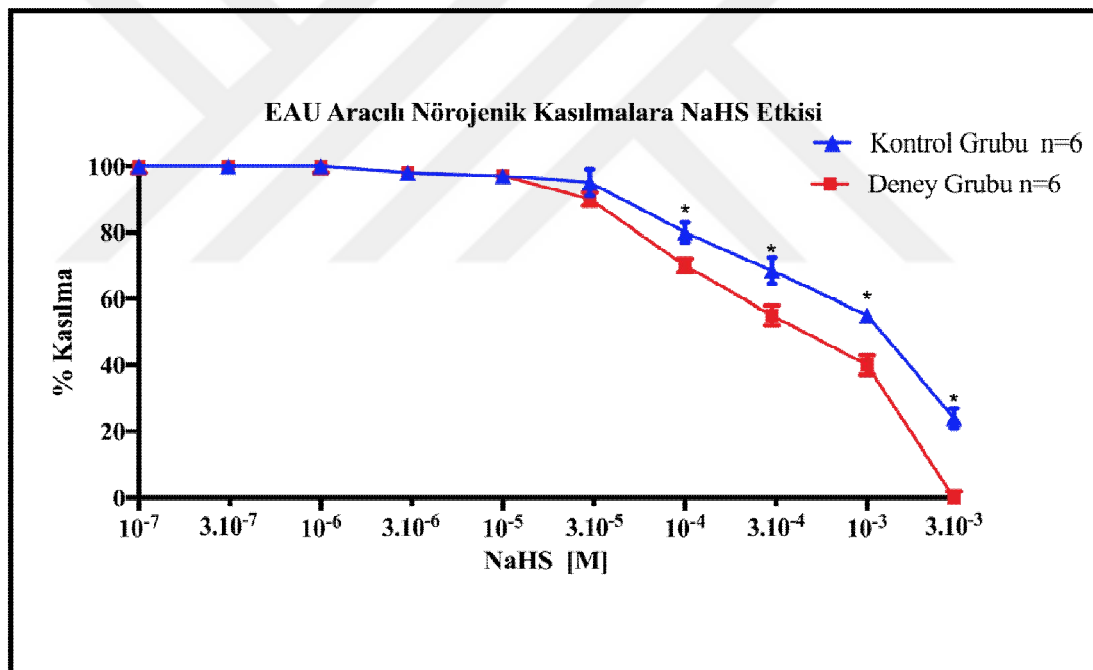
Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 9 ± 1
Sham	% 8 ± 1
Deney	% 9 ± 1

Yapılan deneyde Kontrol, deney ve sham grubunun arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda %9 gevşeme görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. Grafik 8, Tablo 8) $p > 0,05$, $n=6$

4.4.1. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi

Safra kesesi striplerinde kontrol, sham ve deney gruplarında guanetedin ve indometasin varlığında EAU (16 Hz) kontrol kasılma yanıtları elde edildi. Kasılma yanıtları stabilize olduktan sonra ortama H₂S donörü olan NaHS (10^{-7} – $3 \cdot 10^{-3}$ M), L-sistein (endojen H₂S üretimi prekürsörü) (10^{-6} - $3 \cdot 10^{-3}$ M) D,L- proprajilglisin (PAG-CSE enzim inhibitörü) (10^{-6} – $3 \cdot 10^{-3}$ M) eklenerek EAU aracılı nörojenik kasılma yanıtları üzerine etkileri incelendi.

4.4.1. EAU Aracılı Nörojenik Kasımlara NaHS Etkisi



Grafik 9. Kontrol ve Deney grubunda EAU (16 Hz) aracılı nörojenik uyarı ile kasılan dokularda D, L PAG (10^{-7} - $3 \cdot 10^{-3}$ M)'in gevşetici etkisi.

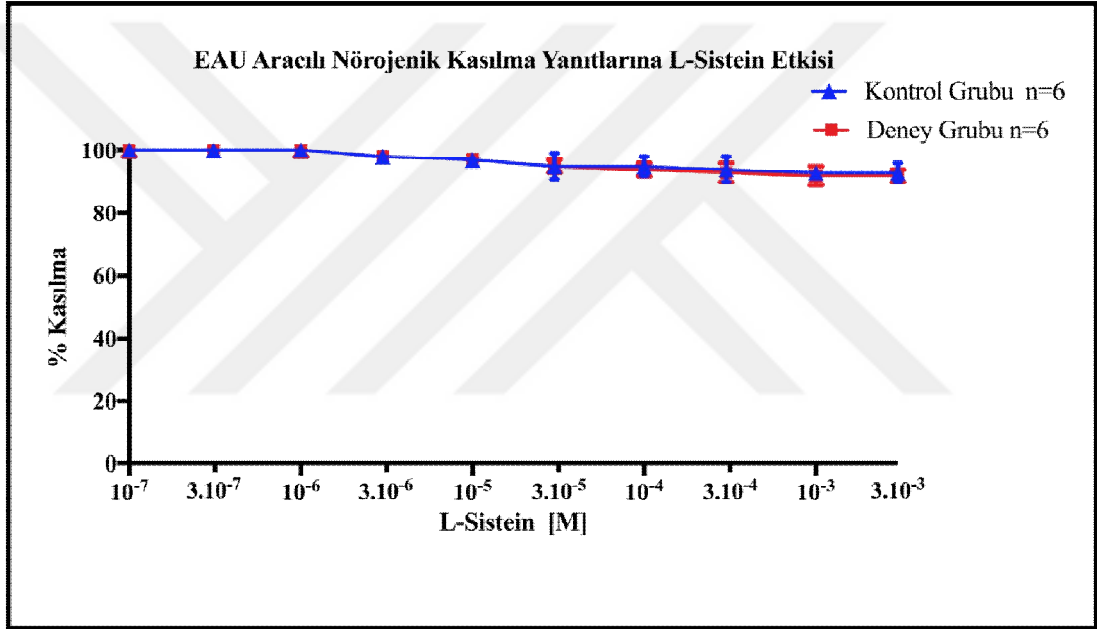
Gevşeme EAU (16 Hz) aracılı nörojenik kasımlara gevşeme karşılığı yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 9. Guanetedin Ve İndometasin Varlığında EAU (16 Hz) Aracılı $3 \cdot 10^{-3}$ NaHS Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 77.5 ± 1.1
Sham	%78 ± 2.1
Deney	%95 ± 2.2*

Yapılan deneyde Kontrol, sham grupları arasında gevşemede farklılık olmadığı ancak deney grubunda %17 daha fazla gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak fark vardır. (Grafik 9, Tablo 9)* $p < 0,05$, $n=6$

4.4.2 EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına L-Sistein Etkisi



Grafik 10. Kontrol ve Deney grubunda EAU (16 Hz) ile kasılan dokularda L-Sistein (10^{-6} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

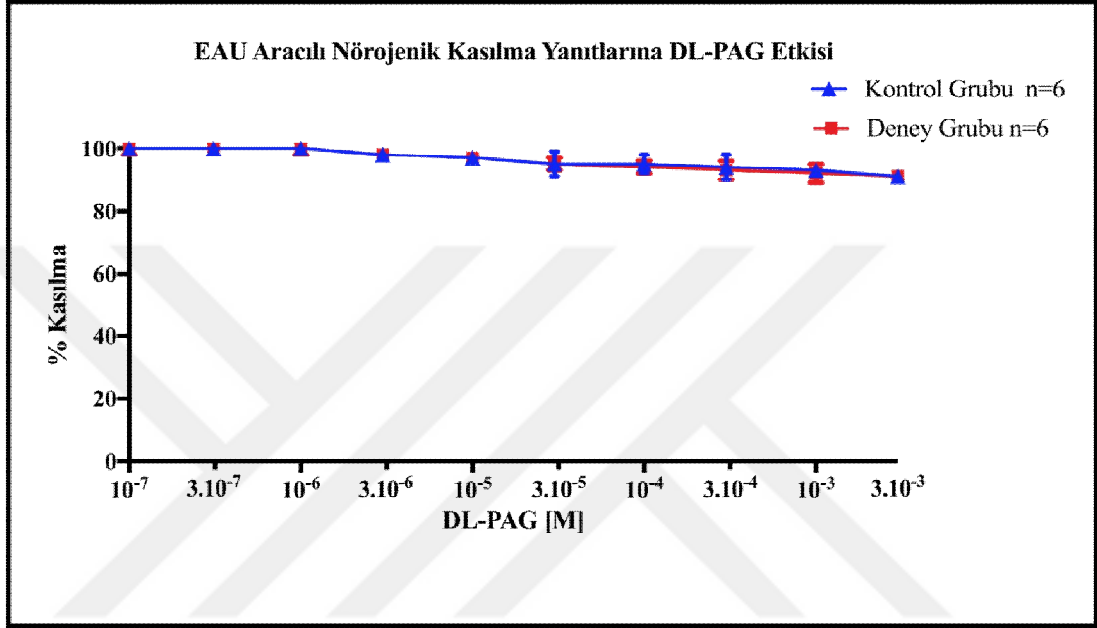
Gevşeme EAU (16 Hz) ile oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 10. Guanetidin ve İndometasin Varlığında EAU Aracılı L-Sistein Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 9.5 ± 1.1
Sham	% 9 ± 2.1
Deney	% 9.2 ± 2

Yapılan deneyde Kontrol, Sham ve Deney grupları arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda %9 gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak fark yoktur. (Grafik 10, Tablo 10) $p > 0,05$, $n=6$

4.4.3. EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına DL-PAG Etkisi



Grafik 11. A Kontrol, Sham ve Deney grubunda EAU (16 Hz) ile kasılan dokularda D,L PAG (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

Gevşeme EAU (16 Hz) oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

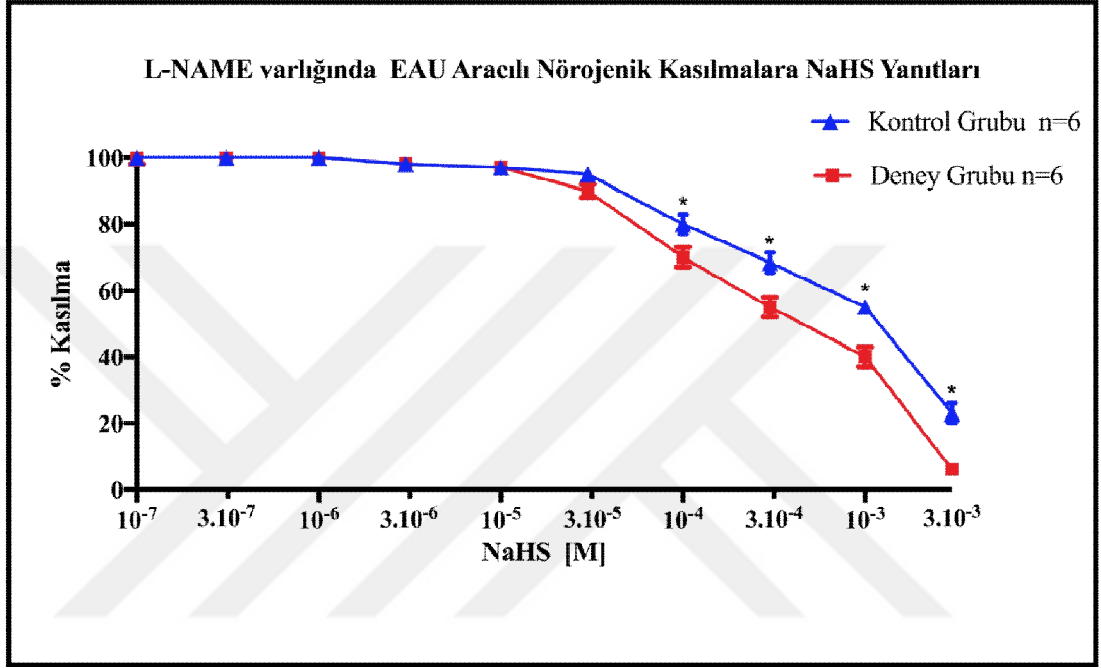
Tablo 11. Guanetidin Ve İndometasin Varlığında EAU Aracılı D,L PAG Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 9 ± 1.1
Sham	% 9 ± 2.1
Deney	% 9 ± 1

Yapılan deneyde Kontrol, sham grupları arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda % 9 gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak anlamlı fark yoktur. (Grafik 11, Tablo 11) $p > 0,05$, $n=6$

4.4.4. EAU Aracılı NO Bağımsız Nörojenik Kasılma Yanıtları Üzerine Hidrojen Sülfür'ün Etkisi

4.4.4.1 L-NAME varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasımlara NaHS Yanıtları



Grafik 12. Kontrol, Sham ve Deney grubunda EAU (16 Hz) ile kasılan dokularda NaHS (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'ün gevşetici etkisi.

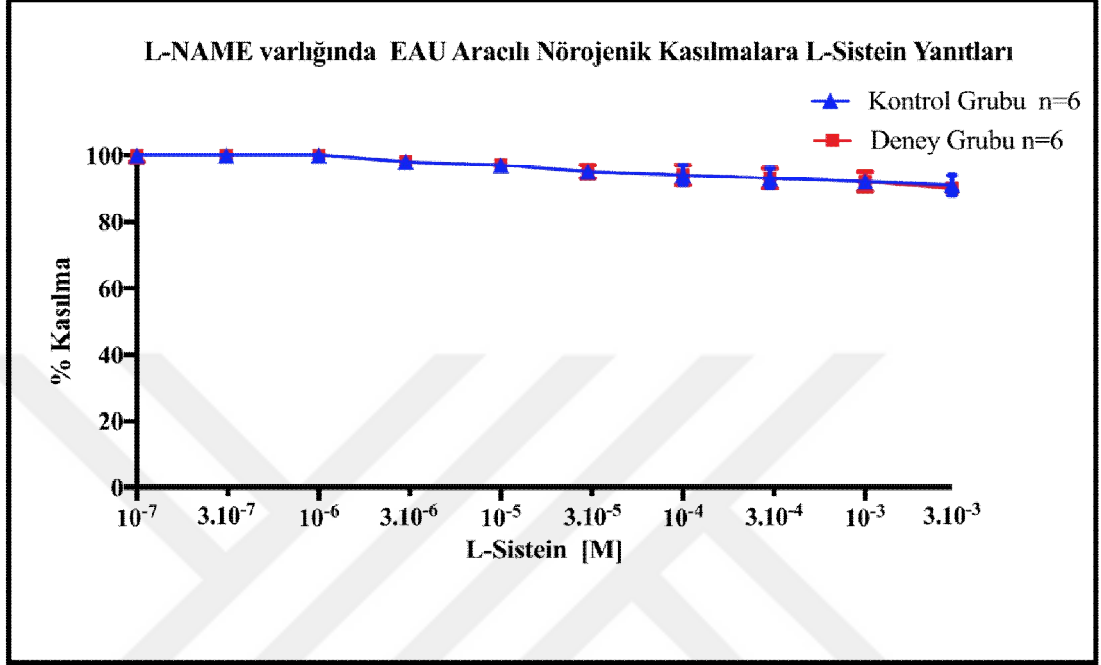
Gevşeme 16 Hz EAU (16 Hz) oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 12. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı 3×10^{-3} M NaHS Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 77.5 ± 1.1
Sham	%78 ± 2.1
Deney	%95 ± 2.2 *

Yapılan deneyde Kontrol, sham grupları arasında gevşemede farklılık olmadığı deney grubunda %17.5 daha fazla gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak fark vardır. (Grafik 12, Tablo 12) *p<0,05, n=6

4.4.4.2 L-NAME varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına L-Sistein Etkisi



Grafik 13. Kontrol, Sham ve Deney grubunda EAU (16 Hz) ile kasılan dokularda L-Sistein (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

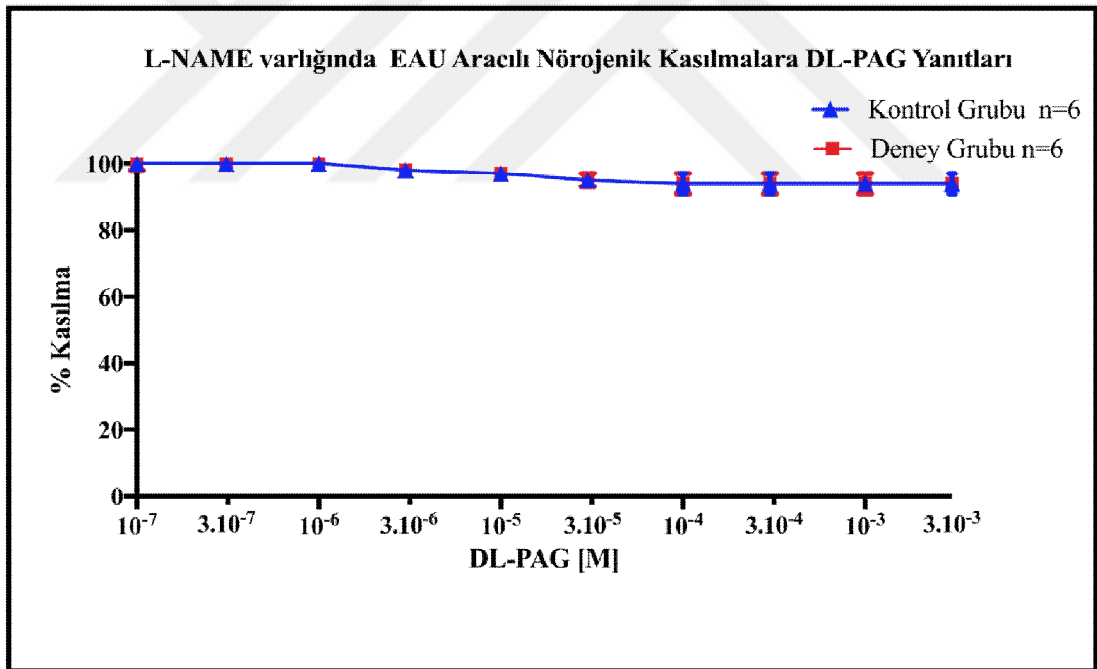
Gevşeme EAU (16 Hz) ile oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 13. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı L-Sistein 3×10^{-3} M Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 9.5 ± 1.1
Sham	%8 ± 2.1
Deney	%8 ± 2.2

Yapılan deneyde Kontrol, sham vgrupları arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda %8 gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak fark yoktur. (Grafik 13, Tablo 13) $p > 0,05$, $n=6$

4.4.4.3 L-NAME Varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına DL-PAG Etkisi



Grafik 14. Kontrol, Sham ve Deney grubunda EAU (16 Hz) ile kasılan dokularda D, L PAG (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

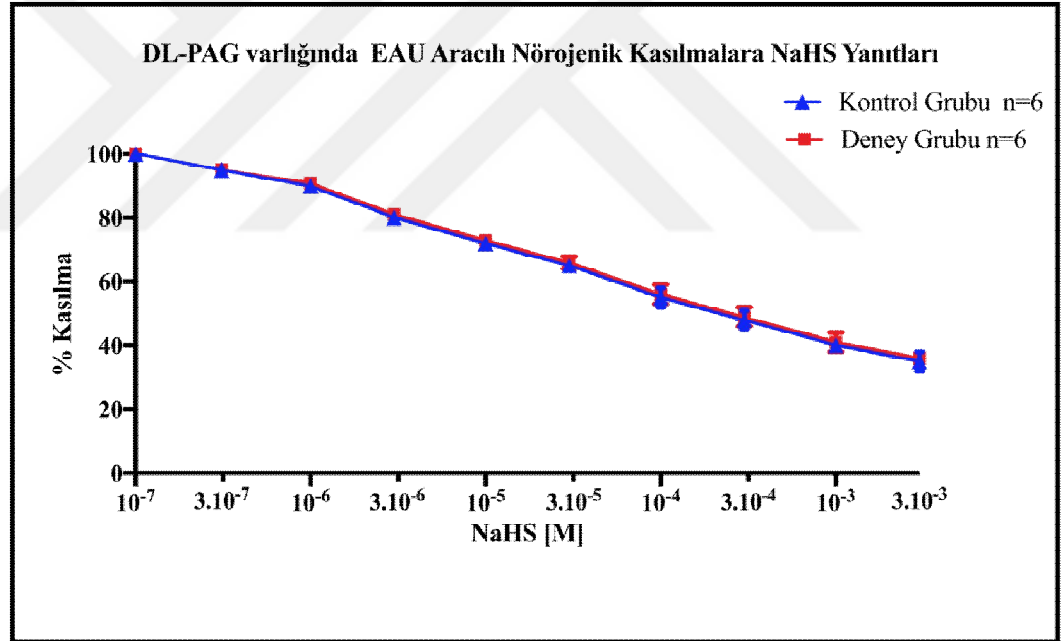
Gevşeme EAU (16 Hz) oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 14. Guanetedin, İndometasin, L-NAME Varlığında EAU Aracılı D,L PAG Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 5.5 ± 1.1
Sham	% 5 ± 2.1
Deney	% 5 ± 1.2

Yapılan deneyde Kontrol, sham grupları arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda %7.1 gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak aralarında fark yoktur.(Grafik 14, Tablo 14) $p > 0,05$, $n=6$

4.4.4.4 DL-PAG Varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına NaHS Etkisi



Grafik 15 Kontrol ve Deney grubunda EAU (16 Hz) ile kasılan dokularda DL-PAG varlığında NaHS (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

Gevşeme EAU (16 Hz) oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

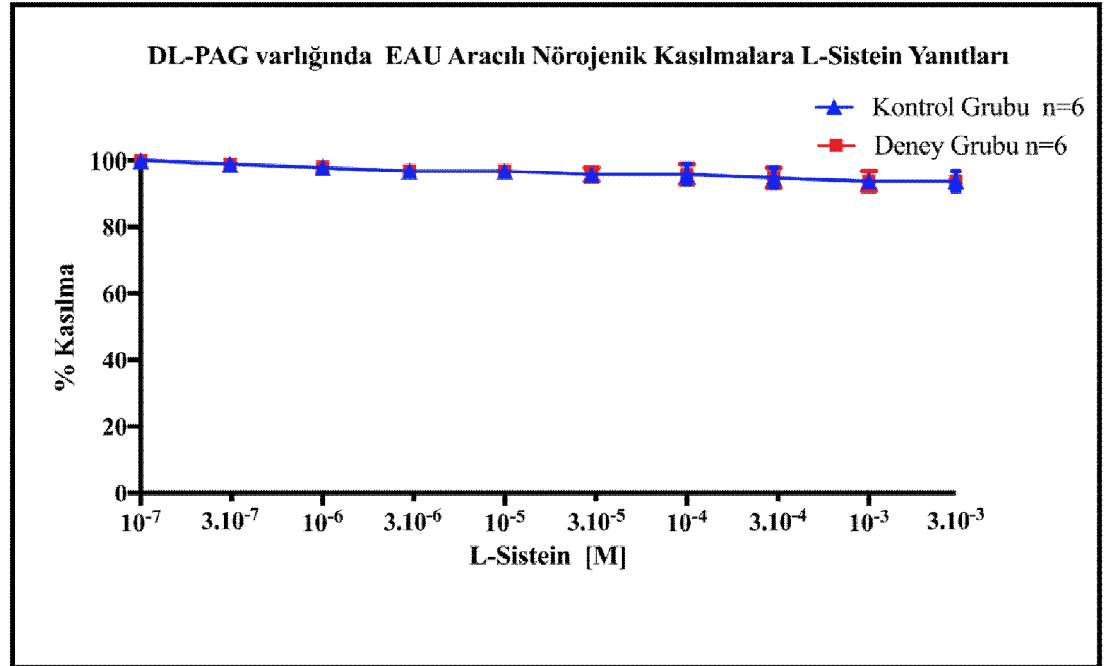
Tablo 15. Guanetedin, İndometasin, DL-PAG Varlığında EAU Aracılı NaHS Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 65.5 ± 1

Sham	% 65 ± 2.1
Deney	% 66 ± 1

Yapılan deneyde Kontrol, sham grupları arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda 3×10^{-3} M konsantrasyonda % 65.1 gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak aralarında fark yoktur. (Grafik 15, Tablo 15) $p > 0,05$, $n=6$

4.4.4.5 DL-PAG Varlığında EAU Aracılı Nörojenik Kasılma Yanıtlarına L-Sistein Etkisi



Grafik16.Kontrol ve Deney grubunda EAU (16 Hz) ile kasılan dokularda DL-PAG varlığında L-Sistein (10^{-7} - 3×10^{-3} M)'in gevşetici etkisi.

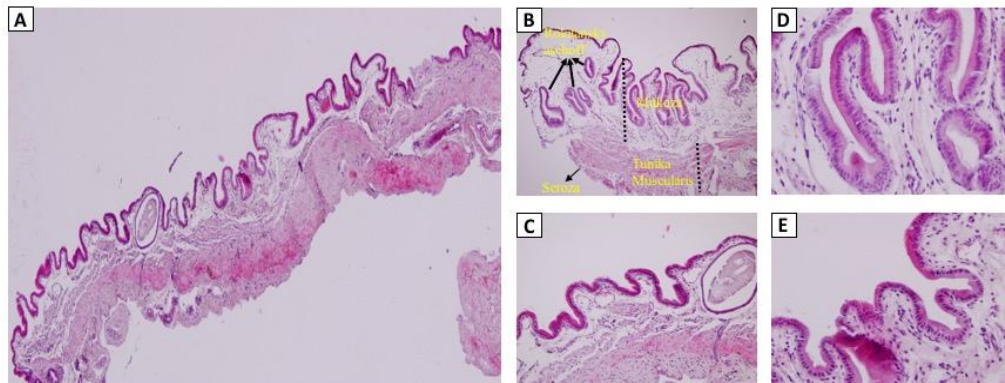
Gevşeme EAU (16 Hz) oluşan kasılmaların yüzdesi olarak ifade edildi.

Tablo 16. Guanetedin, İndometasin, DL-PAG Varlığında EAU Aracılı 3×10^{-3} M L-Sistein Gevşetici Etkisi

Grup	Gevşeme Yüzdesi + Standart Sapma
Kontrol	% 65.5 ± 1
Sham	% 65 ± 2.1
Deney	% 66 ± 1

Yapılan deneyde Kontrol, sham grupları arasında farklılık olmadığı ancak tüm gruplarda 3×10^{-3} M konsantrasyonda % 65.1 gevşeme olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak aralarında fark yoktur. (Grafik 16, Tablo 16) $p > 0,05$, $n=6$

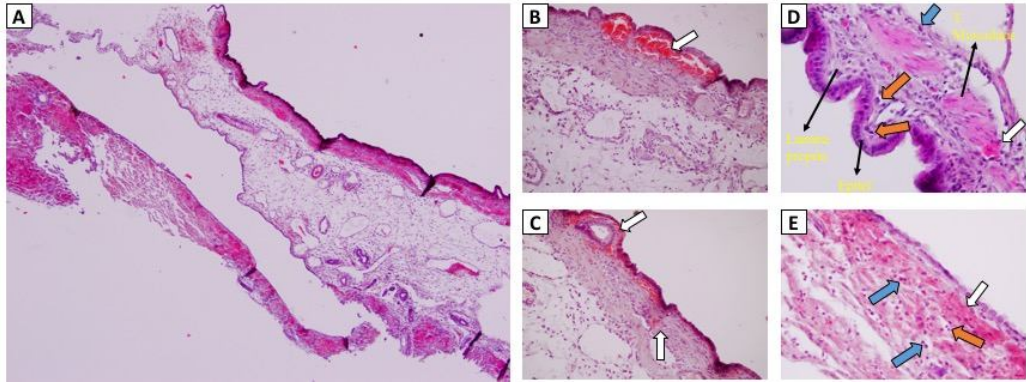
5. Kontrol Ve Deney Grupları Safra Sesesi Dokularının Histolojisi



Şekil 10. Kontrol grubu safra kesesi histolojisi.

A; 4X, B-C; 10X ve D-E; 40X büyütme. Hematoksilen-Eosin (HE)

Şekilde kontrol grubu safra kesesinin 4x, 10x ve 40x büyütülerek Hematoksilen-Eosin (HE) boya ile boyanmış preparatlar görülmüştür. Dokunun katmanları gösterilmiştir. Ashof-Rocitansky sinüsleri, seroza, tunica muscularis, mukoza rahatlıkla seçilmektedir. Safra kesesinde. Hemoraji ve mukozaya lenfosit infiltrasyonu olmadığı görülmüştür. Bu bulgular safra kesesinin patolojik olmadığını göstermiştir.



Şekil 11. Deney grubu safra kesesi histopatolojisi.

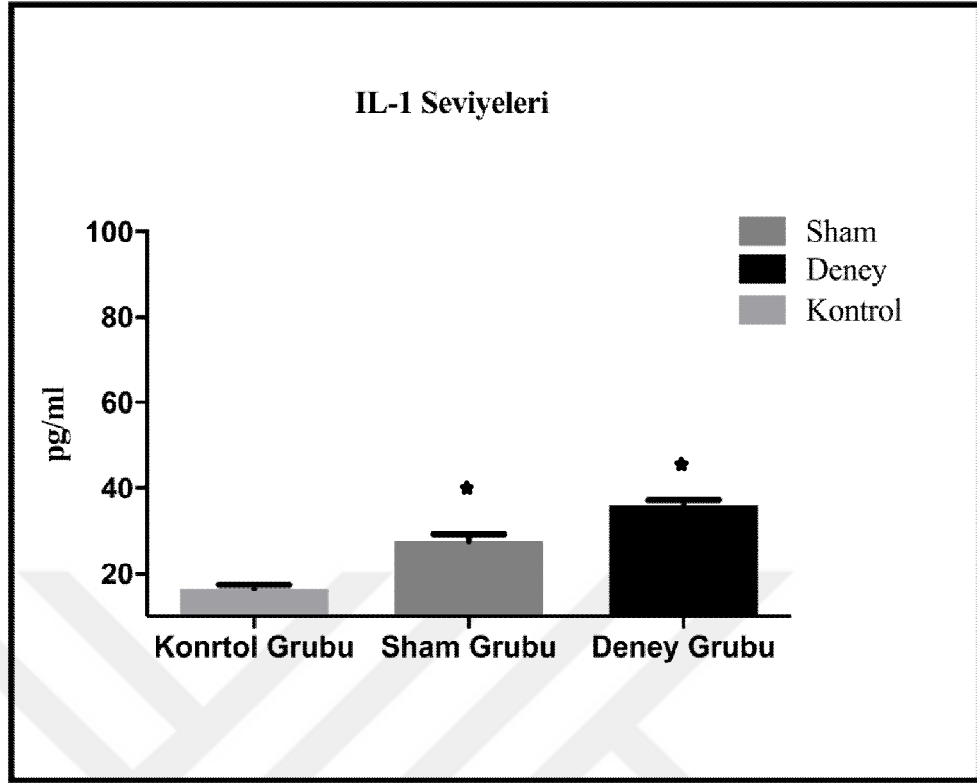
A; 4X, B-C; 10X ve D-E; 40X büyütme. Beyaz oklar; hemoraji alanları (mukoza ve kas dokusu boyunca yaygın hemorajik alanlar izlendi), turuncu ve mavi oklar; kandan göç eden lenfositler hücreler.

Deney grubu histopatolojik kesitlerde epitel kıvrımlarının düzleştiği turuncu ve mavi oklarda lenfositlerin mukozaya göç ettiği görülmüştür. Ashof-Rokitansky sinüslerinin varlığının azaldığı ve kaybolduğu gözlenmiştir. Beyaz oklarla ise hemorajik alanlar gözlenmiştir. Düz kas ve mukoza boyunca hemorajik alanlar izlenmiştir. Safra kesesinin düz kas yapısında değişiklikler kesenin hacminin büyümesine bağlı olarak incelendiği görülmüştür.

6. Biyokimyasal Belirteçler IL-1, IL-6, TNF-a Seviyeleri

6.1 IL-1 Seviyeleri

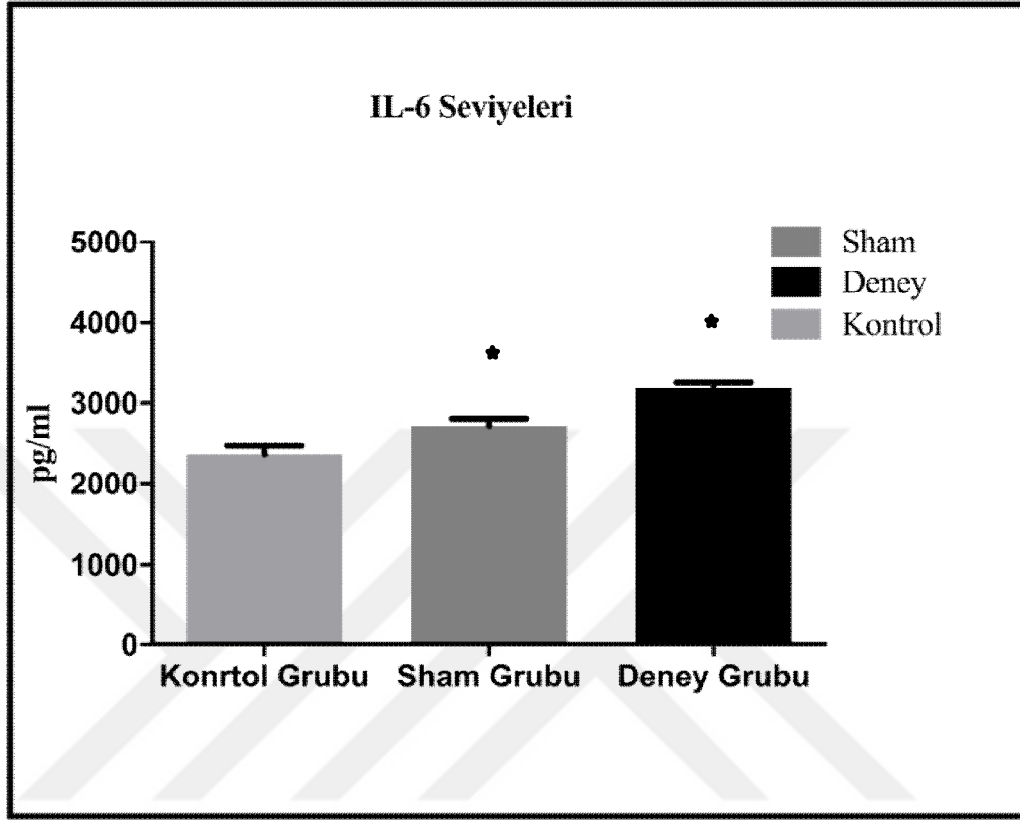
Grafik 17. IL-1 Seviyeleri



IL-1 seviyesi kontrol grubunda 18 ± 1 pg/ml, Sham grubunda 29 ± 2 pg/ml, Deney grubunda ise 37 ± 1 pg/ml olarak ölçülmüştür. İnflamasyona paralel olarak miktarlarının artmış olduğu belirlenmiştir. İstatiksel olarak fark vardır.★ ($p < 0.05$ $n=6$)

6.2 IL-6 Seviyeleri

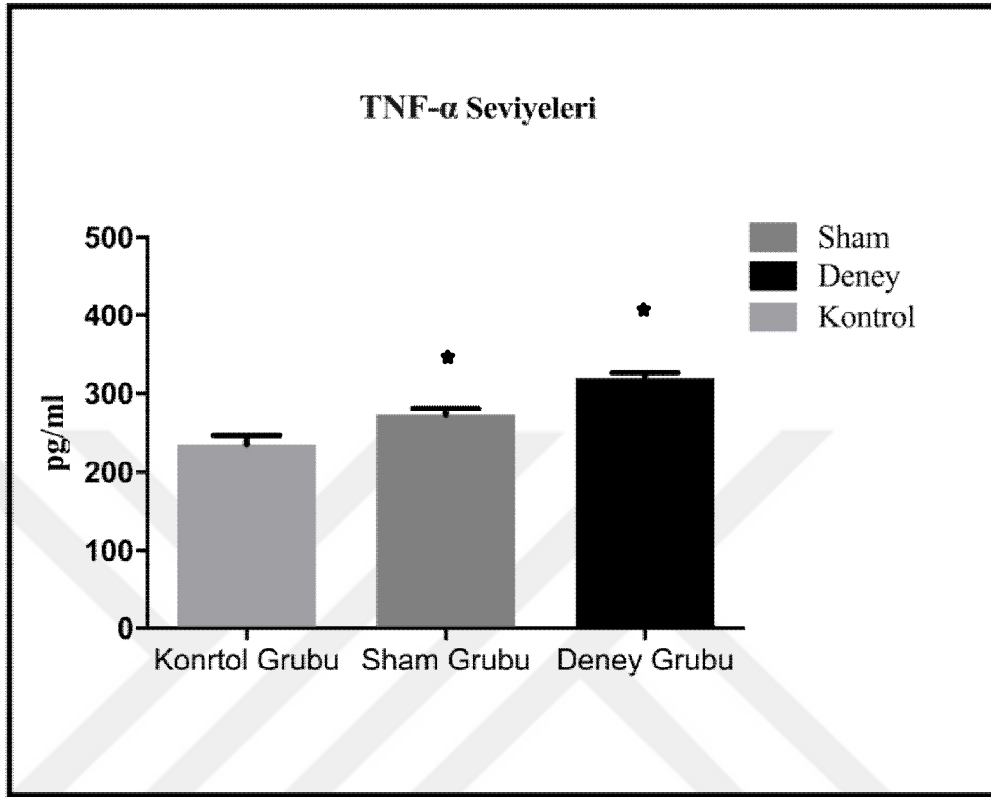
Grafik 18. IL-6 Seviyeleri



IL-6 seviyesi kontrol grubunda 2359 ± 89 pg/ml, Sham grubunda 2650 ± 60 pg/ml, Deney grubunda ise 3250 ± 55 pg/ml olarak ölçülmüştür. İnflamasyona paralel olarak miktarlarının artmış olduğu belirlenmiştir. İstatiksel olarak fark vardır. ★($p < 0.05$ n=6)

6.3 TNF-a Seviyeleri

Grafik 19. TNF-a Seviyeleri



TNF-a seviyesi kontrol grubunda 235 ± 32 pg/ml, Sham grubunda 280 ± 25 pg/ml, Deney grubunda ise 325 ± 20 pg/ml olarak ölçülmüştür. İnflamasyona paralel olarak miktarlarının artmış olduğu belirlenmiştir. İstatiksel olarak fark vardır. * ($p < 0.05$ n=6)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında hidrojen sülfürün normal ve akut kolesistit safra kesesi dokusundaki gevşetici etkileri incelenmiştir. Araştırmamız izole organ banyosunda yapılmış olup, standart gevşeme yanıtlarının yanında, elektriksel alan uyarısı (EAU) da kullanılarak gevşeme yanıtları incelenmiştir. NaHS ile gevşeme yanıtları alınırken gevşemenin mekanizmasını aydınlatmak için NOs inhibitörü L-NAME, CBS enzim inhibitörü D,L PAG kullanılmıştır. NO ve hidrojen sülfürün prekürsörü olan L-Sistein çalışmamızın içerisine dahil edilerek, mekanizmayı aydınlatma çalışmamız daha da genişletilmiştir. Aynı inhibitör maddeler EAU aracılı kasılma yanıtları alınmadan önce de uygulanarak dokunun fizyolojik süreçlerinde hidrojen sülfürün etkisi ve etki mekanizmaları araştırılmıştır.

Daha önce Zhang ve ark. yaptığı çalışmada safra kesesinde CBS ve CSE enzim ekspresyonu gösterilmiştir.(Zhang et al., 2013) Ancak hidrojen sülfürün safra kesesi üzerinde etkisi organ banyosu ile incelenmemiştir. Hidrojen sülfürün gastrointestinal sistemde etkileri geniş bir şekilde incelenmiş, ancak safra kesesine ait çalışma sayısının sınırlı olduğu görülmüştür. Çalışmamızda hidrojen sülfürün etkileri hem normal hemde patolojik dokuda araştırılmıştır. Karbakolle kastığımız kontrol grubunda hidrojen sülfür % 75 gevşeme yaparken, deney grubunda % 95 gevşeme meydana getirmiştir. Normal dokuyu gevşeten hidrojen sülfür akut kolesistit dokuyu daha fazla gevşetmiştir. İnflame dokularda düz kas gevşemesi bozulmaktadır. Bu bağlamda hidrojen sülfürün inflame dokuda güçlü bir gevşeme yapması oldukça anlamlı bir durum olup, bu durum H₂S'in tedavi opsiyonlarını oldukça artırmaktadır. Tenaguu ve arkadaşları tavşan ve kobay ileumunda yapılan asetikolin ile indüklenmiş kasılmaları hidrojen sülfürün inhibe ettiği gösterilmiştir.(Teague et al., 2002) Başka bir çalışmada ise safra kanalı ligasyonu ile yapılan sirozda venlerde hidrojen sülfürün gevşemeye sebep olduğu görülmüştür. Siroz olmayan doku da ise gevşemenin aynı olduğunu bildirmişlerdir. Hidrojen sülfürün gastrointestinal sistem düz kasında gevşetici mekanizmasının tam olarak bilinmemektedir. Vasküler düz kasta ise K_{ATP} kanallarını açarak hiperpolarizasyona ve kalsiyum kanallarını kapatarak düz kas gevşemesine sebep olduğu anlaşılmıştır.(W. Zhao et al., 2001) Damar düz kasında etkisi çok iyi bilinen NO ile yapılan bir deneyde NO ya duyarlı guanilat siklaz inhibitörü ODQ kullanıldığında NO etkisi ortadan kalkmaktadır. ODQ

hidrojen sülfürün yaptığı gevşeme etkisini geri çevirmemiştir. Hidrojen sülfür damar düz kasını gevşetirken NO yolağından bağımsız bir şekilde etki göstermektedir. (W. Zhao et al., 2001)(Qu et al., 2008)(Łowicka & Bełtowski, 2007)Deneylelerimizde Nitrikoksit Sentetaz inhibitörü L-NAME ile yaptığımız deneylerde hidrojen sülfürdeki gevşeme oranı değişmemiş sabit kalmıştır. Yani gevşeme NO bağımsız olarak gerçekleşmiştir. NO aracılı mekanizmalar ile gerçekleşen gevşeme birçok fizyolojik olayda rol almasına rağmen, bunun yanında nitrik oksit aracılı mekanizmaların tetiklenmesi ve masif miktarlarda NO oluşumunun patolojik süreçlerde de çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu bağlamda hidrojen sülfürün nitrik oksit aracısız mekanizmaları kullanıyor olması nitrik oksitin yararlı etkilerinden faydalanılabılırken, zararlı etkilerinden kaçınılması anlamına gelmektedir ki bu durum hidrojen sülfürün kullanılabilirliğini daha da artırmaktadır. İlaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Sıçan pulmoner arterinde Wang Y ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sodyumnitropurissid gevşetici etkisinin DL PAG varlığında azaldığı, NaHS etkisinin ise L-NAME varlığında azaldığı göstermiştir. Bu bulgular hidrojen sülfür ve nitrik oksit ajanlarının birbiri ile yakından ilişkili mekanizmalar ile düzenlendiğini göstermektedir.

Ortamda hidrojen sülfür prekürsörü L- sistein varlığında hidrojen sülfür üreten enzim CBS inhibitörü DL-PAG varlığında gevşeme oranı DL-PAG yokken %20 daha fazladır. L-NAME de aynı deney ortamına eklendiğinde gevşeme oranında bir değişiklik olmamıştır. Buradan da anlaşılacağı gibi L-Sistein yanıtlarını D,L PAG değiştirmiş fakat nitrik oksit sentaz inhibitörünün bu gevşeme üzerine bir etkisi olmamıştır. Bu bulgular hidrojen sülfürün gevşeme mekanizmasının nitrik oksit üzerinden olmadığına dair bulgularımızı desteklemektedir. Mide fundusunda yapılan bir çalışmada ise NaHS ile oluşan kontraktilitenin NO vericileri ile azaldığını kaydetmişlerdir (Meng et al., 2017). Bu çelişkili sonucun nedeni çalışılan dokularda nitrik oksit ve hidrojen sülfür üzerinden yürüyen gevşeme mekanizmalarının değişik dokularda değişik dominasyonda olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu durum aynı zamanda kullanılan konsantrasyon farkları ile de ilişkili olabilir. (Giuffrè, 2018)

Literatürde yapılan çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar mevcuttur. Sıçan torasik aortasında sodyumnitropurussid ile oluşan gevşemeyi NaHS in arttığını Hosoki ve arkadaşları belirtmelerine rağmen Zhao ve arkadaşları ise azalttığını belirtmiştir(Hosoki et al., 1997)(Weimin Zhao & Wang, 2002).Ancak yapılan deneylerde düşük ve yüksek doz farklılığı inceleyen bir çalışmada ise sonuçlar, düşük dozlarda NaHS ile tetiklenen sıçan aortik halka kasılmalarının, L-tipi kanallar aracılığıyla Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ kotransport ve Ca^{2+} akışının aktivasyonu ile aracılık edildiğini kuvvetle göstermektedir.(Orlov, Gusakova, Smaglii, Koltsova, & Sidorenko, 2017) Dolayısıyla oluşan farklı sonuçların NaHS dozu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Başka bir çalışmada ise tavşan aort ve renal arterlerinde düşük dozla gevşeme yüksek dozla ise kasılma edilme edilmiştir.(Caprnda et al., 2017). Sonuç olarak gevşeme sonucu doza bağımlı olarak kasılmaya doğru geçiş yapmıştır. Bizim çalışmamızda izole organ banyosunda kasılma gözlenmemiştir. Ancak EAU aracılı norojenik kasılma yanıtlarında düşük dozlar sonrasında bazal tonus kasılma oranı artmış, kasılma amplitüdü azalmıştır.

Solunum düz kası üzerinde bir hidrojen sülfür donorü olan GYY4137 tarafından gevşediği görülmüştür.Ortama K_{ATP} inhibitörü olan glibenklamid eklendikten sonra GYY4137' nin etkisi ortadan kalkmıştır.Solunum düz kasında hidrojen sülfür donörlerinin K_{ATP} kanalı aracılığıyla olduğu görülmüştür.(Fitzgerald et al., 2014)Bu etki sonrası obstruktif akciğer hastalıklarında tedavi edici özelliğinin ileri düzeylerde araştırılmasını tavsiye etmişlerdir.

Çalışmamızda izole organ banyosunda aldığımız NaHS gevşeme yanıtları norojenik kasılma yanıtları EAU aracılı kasılma yanıtları da incelenmiştir.Gevşeme yanıtları yüzdeleri arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur.Ortamda NOs inhibitörü L-NAME varken sonuçlar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark yoktur.CBS enzim inhibitörü varlığında ise norojenik ve nörojenik olmayan kasılmaya NaHS yanıtları değişmemiştir.CBS enzim inhibitörü D,L PAG varlığında yanıtlar izole orhan banyosu ve EAU aracılı kasılma yanıtlarında farklılık oluşturmamıştır.

Düşük dozlarda NaHS organ banyosunda bir gevşeme meydana getirmemiştir ancak EAU aracılı gevşeme yanıtlarında bazal tonusun artmasına ve kasılma amplitüdün azalmasına sebep olmuştur.

Distansiyonda olan kolon için intraperitoneal verilen hidrojen sülfür donörü kolonda gevşeme ve ağrı duyusunu azaltmıştır.(Distrutti et al., 2006)

Parkman metodu ile oluşturulan kolesistit modelinde inflamasyonun biyokimyasal tayini için kullanılan IL-1, IL-6, TNF-a kullanılmıştır(Parkman et al., 1999).Deney grubunda ve Sham grubunda anlamlı bir şekilde miktarları artmıştır. Daha önce bu yönde yapılan bir araştırma literatürde tespit edilmemiştir. Ancak lokal bulguların inflamasyonun başladığı ve sistemik yanıtın başladığı doğrulanmıştır. Çalışmamızda yapılan histoloji ve patoloji preparatlarında infiltrate lökositler, kaybolan parmaksı çıkıntılar ve Ashoff-rokitansy sinüslerinin kaybolması kolesistit oluşumun histopatolojik kanıtlarıdır. Kolesistit preparatlarını incelen bir çalışmada Ashoff-Rokitansky sinüslerin azalması kolesistit için anlamlı bulunmuştur. submukozaya infiltrate olan lökositler ise inflamatuvar sürecin oluştuğunu göstermiştir. Gadacz'ın yayınladığı bulgular ile kolesistit bulgularımız uyumludur(Y. Kimura et al., 2007) (Gadacz T R 1996).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmalarımızda hidrojen sülfür donörü olan NaHS ile yapılan izole organ banyosu ve elektriksel alan uyarıcı kasılmaya gevşeme yanıtlarında tüm gruplarda gevşeme olmuştur. Ancak Deney grubu olan akut kolesistit safra dokusu striplerinde gevşeme istatistiksel olarak anlamlı ve daha fazla olduğu belirlenmiştir.

NO ve Hidrojen sülfürün gevşeme sağlayan mekanizmasının ortak yollar üzerinden olabileceği daha önce tartışma bölümünde değinilmiştir. Elde ettiğimiz gevşeme etkisinde NO bağımsız ve endojen hidrojen sülfür etkisini uzaklaştırmak için inhibitörler kullanmıştık. NO bağımsız gevşeme yanıtlarında NOs enzim inhibitörü hidrojen sülfür gevşeme yanıtını azaltmamıştır. Safra kesesinde hidrojen sülfür gevşeme yanıtları NO bağımsız olabileceği düşünülmüştür. Ancak kesinlik ifade etmemektedir.

Hidrojen sülfür endojen sentezini gerçekleştiren CBS enzim inhibitörü ortama eklendiğinde NaHS yanıtları azalmıştır. Buradan yola çıkıldığında hidrojen sülfürün ortaya çıkardığı gevşeme CBS bağımlıdır.

Elektriksel alan uyarı aracılı kasılmaya gevşeme yanıtlarında ise kontrol, sham, deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak elektriksel alan aracılı kasılma yanıtlarına NaHS gevşeme yanıt alındığında düşük konsantrasyonlarda bazal tonus arttığı ve amplitüdün de azaldığı gözlemlenmiştir. Değerlendirme olarak literatürde de benzer sonuçlar mevcut ancak çelişkilidir. Hidrojen sülfür etkisin konsantrasyon bağımlı olduğu düşünülmüştür.

Hidrojen sülfür etkileri sebebiyle birçok kullanımda ilaç ile kombine edilerek anti-İflamtuvar ve düz kas gevşetici etkisinde yararlanılmak istenmiştir. Çalışmamızda ortaya koyduğumuz gibi safra kesesinde güçlü gevşeme yanıtları hidrojen sülfür donörü ajanların terapötik olabileceği ortaya konmuştur.

Hidrojen sülfürün gevşeme mekanizması ve konsantrasyon ilişkisi ortaya tam olarak çıkartıldığında medikal kullanımında önemli kullanım alanları görülecektir.

Hidrojen sülfür ve gastrointestinal sistem arasındaki mekanizmaları araştırarak bilim insanlarına önerimiz konsantrasyon ilişkili yanıt değişimlerini gözardı etmemeleri olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- 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*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., ... Akdis, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 701–721. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>
- Behar, J. (2013). Physiology and Pathophysiology of the Biliary Tract: The Gallbladder and Sphincter of Oddi—A Review. *ISRN Physiology*.
<https://doi.org/10.1155/2013/837630>
- Caprnda, M., Qaradakh, T., Hart, J. L., Kobylak, N., Opatrilova, R., Kruzliak, P., & Zulli, A. (2017). H₂S causes contraction and relaxation of major arteries of the rabbit. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.057>
- Chen, X., Jhee, K. H., & Kruger, W. D. (2004). Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine γ -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52082–52086.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C400481200>
- Cotton, P. B., Elta, G. H., Carter, C. R., Pasricha, P. J., & Corazziari, E. S. (2016). Gallbladder and sphincter of Oddi disorders. *Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.033>
- Desrochers, A. (2013). *Schwartz's Principles of Surgery Tenth Edition. Llama and Alpaca Care: Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health: First Edition*.
- Dinarelli, C. A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Distrutti, E., Sediari, L., Mencarelli, A., Renga, B., Orlandi, S., Antonelli, E., ... Fiorucci, S. (2006). Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.
<https://doi.org/10.1124/jpet.105.091595>
- 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. *Anal Biochem*.
- Fiorucci, S., Antonelli, E., Distrutti, E., Rizzo, G., Mencarelli, A., Orlandi, S., ... Wallace, J. L. (2005). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology*, 129(4), 1210–1224.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.07.060>

- Fitzgerald, R., DeSantiago, B., Lee, D. Y., Yang, G., Kim, J. Y., Brian Foster, D., ... An, S. S. (2014). H₂S relaxes isolated human airway smooth muscle cells via the sarcolemmal KATP channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.129>
- Frierson, H. F. (1989). The gross anatomy and histology of the gallbladder, extrahepatic bile ducts, Vaterian system, and minor papilla. *American Journal of Surgical Pathology*. <https://doi.org/10.1097/00000478-198902000-00008>
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/ar1917>
- Giuffrè, A. (2018). Review Article Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous, 2018.
- Han, Y., Qin, J., Chang, X., Yang, Z., Bu, D., & Du, J. (2005). Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats. *Neurosci.Res.*
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
- 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*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6878>
- İ, S. (2004). *No Title* (3rd ed.). İstanbul: Güneş Kitabevleri.
- Jianjuni, Y., Qian, Z., Jun, S., Feiguo, Z., Liang, H., Caifeng, L., ... Yiqun, Y. (2012). Chronic acalculous cholecystitis: Correlation of clinical assessment, laboratory data and final histopathology. *Journal of Medical Colleges of PLA*. [https://doi.org/10.1016/S1000-1948\(12\)60011-2](https://doi.org/10.1016/S1000-1948(12)60011-2)
- Kabil, O., & Banerjee, R. (2014). Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5339>
- Kamoun, P. (2004). Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0072-x>
- Kimura, H. (2000). Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1915>
- Kimura, H. (2014). Production and Physiological Effects of Hydrogen Sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5309>
- Kimura, Y., Takada, T., Kawarada, Y., Nimura, Y., Hirata, K., Sekimoto, M., ... Gadacz, T. R. (2007). Definitions, pathophysiology, and epidemiology of acute cholangitis and cholecystitis: Tokyo Guidelines. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s00534-006-1152-y>
- Lee, S. W., Hu, Y. S., Hu, L. F., Lu, Q., Dawe, G. S., Moore, P. K., ... Bian, J. S.

- (2006). Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20362>
- Linden, D. R., Sha, L., Mazzone, A., Stoltz, G. J., Bernard, C. E., Furne, J. K., ... Szurszewski, J. H. (2008). Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues. *Journal of Neurochemistry*, *106*(4), 1577–1585. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05502.x>
- Łowicka, E., & Bełtowski, J. (2007). Hydrogen sulfide (H₂S) - The third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports*, *59*(1), 4–24.
- Meng, X. M., Huang, X., Lu, H. L., Zhang, C. M., Kim, Y. C., Chen, J., & Xu, W. X. (2017). H₂S-induced gastric fundus smooth muscle tension potentiation is mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Experimental Physiology*. <https://doi.org/10.1113/EP086288>
- Orlov, S. N., Gusakova, S. V., Smaglii, L. V., Koltsova, S. V., & Sidorenko, S. V. (2017). Vasoconstriction triggered by hydrogen sulfide: Evidence for Na⁺,K⁺,2Cl⁻-cotransport and L-type Ca²⁺-channel-mediated pathway. *Biochemistry and Biophysics Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.09.010>
- Özkan K, Özen N, M. Z. (1996). *No Title*. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti.
- Papapetropoulos, A., Whiteman, M., & Cirino, G. (2015). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: A brief, introductory guide for beginners. *British Journal of Pharmacology*, *172*(6), 1633–1637. <https://doi.org/10.1111/bph.12806>
- Parkman, H. P., Bogar, L. J., Bartula, L. L., Pagano, a P., Thomas, R. M., & Myers, S. I. (1999). Effect of experimental acalculous cholecystitis on gallbladder smooth muscle contractility. *Digestive Diseases and Sciences*.
- Parks, E., & Traber, M. G. (2000). Forum Review Article. *Antioxidants & Redox Signaling*, *2*(3), 1–54. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7162>
- Picton, R., Eggo, M. C., Merrill, G. A., Langman, M. J. S., & Singh, S. (2002). Mucosal protection against sulphide: Importance of the enzyme rhodanese. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gut.50.2.201>
- Qu, K., Lee, S. W., Bian, J. S., Low, C. M., & Wong, P. T. H. (2008). Hydrogen sulfide: Neurochemistry and neurobiology. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.05.016>
- Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., & Roth, S. H. (1992). Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.32.040192.000545>
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
- Shefa, U., Kim, M. S., Jeong, N. Y., & Jung, J. (2018). Antioxidant and Cell-Signaling Functions of Hydrogen Sulfide in the Central Nervous System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

<https://doi.org/10.1155/2018/1873962>

- Songur, A. (2009). Safrakesesi ve safra yolları anatomisi ., 12–19.
- Stipanuk, M. H. (2004). SULFUR AMINO ACID METABOLISM: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine. *Annual Review of Nutrition*. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132418>
- Sun, Y., Tang, C., Jin, H., & Du, J. (2011). The vasorelaxing effect of hydrogen sulfide on isolated rat aortic rings versus pulmonary artery rings. *Acta Pharmacologica Sinica*. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.9>
- Szabõ, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd2425>
- Teague, B., Asiedu, S., & Moore, P. K. (2002). The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide *in vitro*: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *British Journal of Pharmacology*, 137(2), 139–145. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704858>
- Toouli, J., & Bhandari, M. (2007). Anatomy and Physiology of the Biliary Tree and Gallbladder. In *Diseases of the Gallbladder and Bile Ducts: Diagnosis and Treatment: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9780470986981.ch1>
- Wang, C., Han, J., Xiao, L., Jin, C.-E., Li, D.-J., & Yang, Z. (2014). Role of hydrogen sulfide in portal hypertension and esophagogastric junction vascular disease. *World Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.1079>
- Zhang, L., Pan, C., Yang, B., Xiao, Y., & Yu, B. (2013). Enhanced expression of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase during acute cholecystitis-induced gallbladder inflammation. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082711>
- Zhao, P., Huang, X., Wang, Z. yu, Qiu, Z. xun, Han, Y. fei, Lu, H. li, ... Xu, W. xie. (2009). Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.05.014>
- Zhao, W., & Wang, R. (2002). H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00013.2002>
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., & Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATPchannel opener. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>

8. ÖZGEÇMİŞ

Dr. Hakan ÇELİK

md.hakancelik@gmail.com

EĞİTİM

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji ABD (PhD - 2018)

Bahçeşehir Üniversitesi-Master Of Business Administration (MBA - 2017)

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi (2012)

Uşak Fen Lisesi-Fen Bilimleri (2006)

İŞ DENEYİMİ

İstanbul Yeniüzyıl Üniversitesi Özel Gaziosmanpaşa Hastanesi 2018-Halen

Sivas Halk Sağlığı Müdürlüğü-Aile Hekimliği 2015-2018

Sivas Numune Hastanesi- Devlet Hizmet Yükümlüsü 2012-2015

ÜYELİKLER

Türk Tabipleri Birliği-İstanbul

YABANCI DİLLER

İngilizce (C2-Advanced)

DOĞUM YERİ / TARİHİ

Tokat/Almus 1988