

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**FÖTAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
HEMİNİN FÖTAL KARACİĞER DOKUSUNA OLAN
ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÇAĞATAY EVRİM AFŞARLAR

TEZ DANIŞMANI

YRD.DOÇ.DR. İ. ONUR ÖZEN

ANKARA 2006

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 İSKEMİ	3
2.2 REPERFÜZYON HASARI.....	5
2.3 HEMİN ve HEMOKSİJENAZ SİSTEMİ	19
2.3.1 Hemin	19
2.3.2 Hemoksijenaz Enzim Ssistemi ve Yıkım Ürünleri.....	22
2.3.3 Ferritin ve Hücre İçi Serbest Demir Regülasyon Sistemleri	25
2.3.4 Hemin, Hemoksijenaz ve Ferritin Etkileşimi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇLAR.....	39
7. ÖZET	40
8. SUMMARY	41
9. KAYNAKLAR.....	42

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Uterin ve umbilikal arterde kan akımının akut olarak azalması fetusta hipoksi ve iskemik organ lezyonlarına dolayısıyla yenidoğanda ciddi morbiditeye ve mortaliteye neden olmaktadır. Maternal hipertansiyon, kronik renovasküler hastalık, uteroplental yetmezlik – plasental infarkt, umbilikal kord basısı gibi gebelik sırasında uterin kan akımını azaltan durumlar immatür fetal dokuların iskemisine ve hipoksik hasarına neden olan önemli nedenlerdir. Bu yenidoğanların, cerrahi strese daha duyarlı oldukları ve postoperatif dönemde renal yetmezlik ile karaciğer disfonksiyonuna daha yatkın oldukları bilinmektedir.

İskemiye maruz kalan dokular üzerinde yapılan çalışmalarda asıl doku hasarının reperfüzyon döneminde olduğu bilinmektedir. Reperfüzyon hasarının oluşmasında süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri önemli rol oynamaktadır. Bu reaktif oksijen türleri ile onların ürünü olan lipid peroksidleri hücre membran destrüksiyonuna ve DNA hasarına neden olurlar. Bu da hücre hasarı ve ölümüne yol açan en önemli sebeptir ⁽²⁴⁾.

İskemi-reperfüzyon hasarının şiddeti dokuların savunma mekanizmalarının yeterli olup olmamasıyla yakından ilişkilidir. Bu stresle kimi dokular kısa, kimileri daha uzun süre baş edebilme yetisine sahiptir. Fötal dokular henüz gelişmekte olan ve matüritelerini tamamlamamış dokular oldukları için iskemi-reperfüzyon hasarına daha duyarlıdırlar. Embriyo olgunlaştıkça, oksijenasyonu ve oksidatif metabolizmaya olan bağımlılığı artmaktadır. Buna paralel olarak serbest oksijen radikallerinin oluşumu da artar ve fetal antioksidan enzimlerin aktivitesi oldukça düşük düzeyde kalır. Bunun sonucu olarak da denge serbest radikallerin oluşumu yönüne doğru kayar ⁽¹⁶⁾.

Şimdiye kadar perinatal hipoksinin en çok nörolojik, kardiyopulmoner ve renal değişiklikler üzerine olan etkileri çalışılmıştır. Buna karşın karaciğer metabolizması ve karaciğer hasarının yenidoğandaki etkileri yeterince bilinmemektedir ⁽⁵²⁾. Karaciğer, yoğun metabolik aktivitesi nedeniyle organizmanın homeostazının sağlanması açısından önemli organlardan biridir ve karaciğer dokusunda meydana gelen bir hasar tüm vücudu etkiler.

Lipid peroksidasyonu ile ilişkili doku hasarı farmakolojik ajanlara hassas olduğundan, perinatal iskemi-reperfüzyon hasarının gelişmesini önleyecek veya azaltacak tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

İskemi-reperfüzyon hasarında hemin ve hemoksijenaz sistemi araştırma konularından birisi olup, antioksidan ve prooksidan etkileri olduğuna dair bir çok karşıt yayın mevcuttur. İskemi-reperfüzyon hasarının biyokimyasal analizinde serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olması açısından myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü ve oluşan serbest oksijen radikallerin de lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarının ölçümü sık olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, fetal karaciğer dokusunun iskemi-reperfüzyon hasarınının MDA ve MPO düzeylerine bakılarak değerlendirilmesi ve heminin fetal karaciğer dokusundaki iskemi-reperfüzyon hasarına olan etkisini araştırmayı amaçladık.

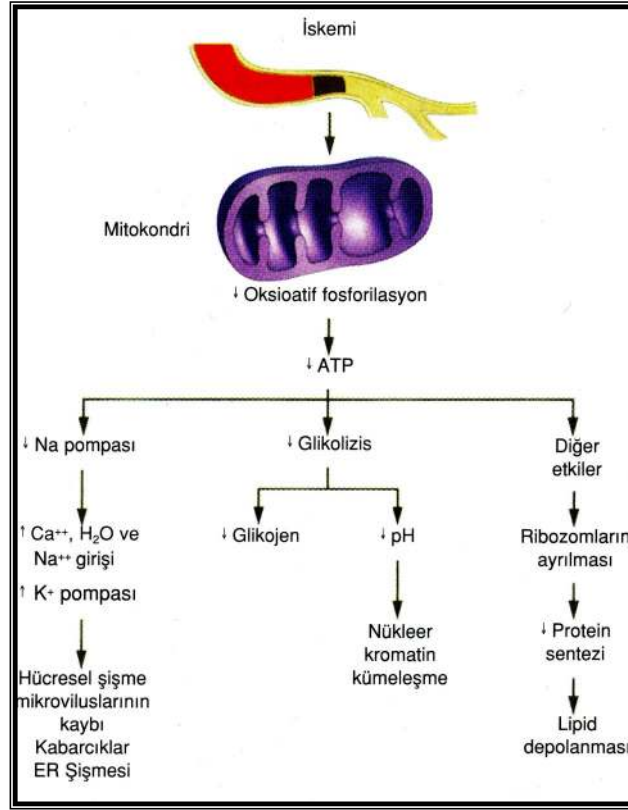
2. GENEL BİLGİLER

2.1 İSKEMİ

İskemi; herhangi bir organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, bunun sonucunda ortaya çıkan oksijen yetersizliği olarak tanımlanmaktadır ⁽³⁶⁾. İskemi sırasında özellikle mitokondriyal elektron transport zincirinde olmak üzere sistemik, sellüler ve subsellüler düzeyde doku metabolizması, yapısı ve biyokimyasal olaylar zincirinde değişiklikler oluşmaktadır ⁽³⁰⁾. Tüm bu olaylar sonucunda hücrede fonksiyon kaybı, hücrel ve interstisyel ödem ve hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Hipoksinin ilk etkisi hücrenin aerobik solunumu yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon üzerinedir. Oksijen basıncının azalması sonucu hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır. İskeminin başlangıcında, hücrenin enerji ihtiyacı glikoliz ile sağlanır ⁽³⁹⁾. Bu da gerekli olan enerji üretimini sağlayamaz ve aşırı uyarılan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, NADH birikimi ve doku asidozunun gelişmesiyle inhibe olur ⁽³⁶⁾.

ATP'nin azalmasıyla birlikte hücre membranının ATP bağımlı "Na pompası"nın aktivitesi azalmaktadır. Bunu hücre içi sodyum birikimi ve potasyumun hücre dışına geçişi izler. Hücre içi Na artışı beraberinde suyun hücre içine geçişini sağlayarak hücre ödemine yol açar. Glikoliz yoluyla hücre içi glikojen depoları hızla tükenir. İskemik dokuda mevcut olan oksijen, oksidatif fosforilasyon için yetersiz kalır. Glikoliz ile oluşan pirüvat Krebs siklusuna giremeyip, laktata dönüşür ve hücre içi pH azalır. Azalan ATP ve pH seviyeleri ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan (GER) ayrılmasına ve polizomların monozomlara ayrışmasına neden olur. Bu durum protein sentezinde azalma ile sonuçlanır. Ayrıca pH'ın azalması hücre içerisindeki enzim aktivitelerini de etkiler ^(18,36,39).



Şekil 1. İskemide oksidatif fosforilasyonun azalmasıyla hücre içerisinde gerçekleşen olaylar ⁽³⁹⁾

İskemik dokuda ATP'nin kullanılması ile önce AMP, daha sonra da adenosin oluşur. Biriken adenosin hızla inozin ve hipoksantine dönüşür. Normal hücrelerde ksantin dehidrogenaz (XDH) enzimi pürin bazlarının hipoksantin ve ksantin üzerinden ürik asite dönüşümünü gerçekleştirir. İskemi sırasında bu enzimin fonksiyonun bozulmasına bağlı olarak hücre içerisinde hipoksantin birikir ⁽³⁶⁾.

Tüm bu olaylar hücreyi fonksiyonel ve yapısal olarak etkiler. İskemi ortadan kalkmadığı sürece hücrede gelişen bu değişiklikler hücre ölümü ile sonuçlanır. İskeminin ortadan kalkması, kimi hücrelerin yaşamalarına olanak tanısa bile, beraberinde daha ciddi olan reperfüzyon hasarını da getirecektir.

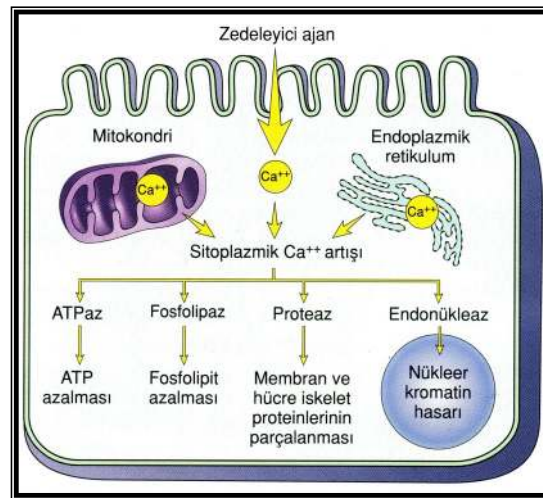
2.2 REPERFÜZYON HASARI

İskemi sırasında oluşan hasarlar reperfüzyon hasarı için başlangıç teşkil eder. Reperfüzyon sonucu oluşan fonksiyonel bozukluklar organdan organa değişim göstermekle birlikte, özellikle mitokondriyal elektron transport zinciri düzeyinde olmak üzere pek çok biyokimyasal olaylar kaskadında değişiklikler meydana getirir ⁽⁵⁷⁾.

Tam olarak mekanizmaları açık olmamakla birlikte iskemik dokuların reperfüzyonunun daha fazla hasar oluşturmaları üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır; (1) *hücre içi Ca^{+2} artışı*, (2) *aktive nötrofillerin hasarlı dokuya göçü*, (3) *serbest oksijen radikallerinin oluşumu*.

Hücre İçi Ca^{+2} Artışı

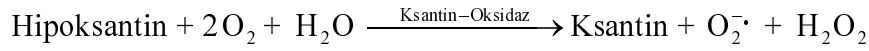
Reperfüzyon ile iskemiden etkilenen hücreler, henüz kendi iyonik çevrelerini tam olarak düzeltemeden hücre içinde biriken Na^+ , Ca^{+2} ile yer değiştirir. Hücre içi artan kalsiyum sırasıyla; ATPaz'ı aktive ederek ATP azalmasına, proteazları aktive ederek membran ve hücre iskelet proteinlerinin parçalanmasına, endonükleazları aktive ederek DNA hasarına ve fosfolipazı aktive ederek de fosfolipidlerin parçalanarak araşidonik asit ürünlerinin oluşmasına neden olur ^(18,36,39).



Şekil 2. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları ⁽³⁹⁾

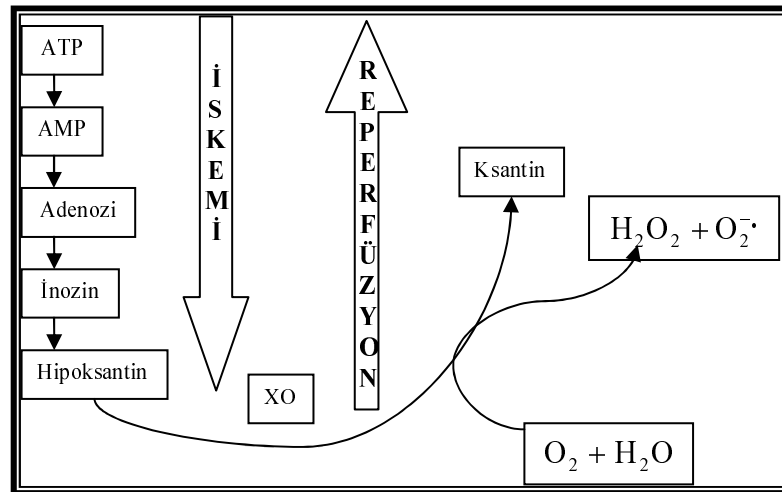
Ksantin Oksidazın (XO) Aktivasyonu

Hücre içi kalsiyum artışının proteazları aktive etmesi ve tiol gruplarının oksidasyonu ile ksantin dehidrogenaz (XDH) enzimi, ksantin oksidaz (XO) formuna dönüşür. Normal şartlarda, XDH enzimi elektron alıcısı olarak NAD^+ 'yi kullanır. Ancak enzim XO formuna dönüştüğünde elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanır ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit radikali oluşturur ⁽⁵⁹⁾. Bunlar da doku hasarını başlatır.



Açığa çıkan serbest oksijen radikalleri (SOR) direkt hasar yaptığı gibi bazı doku proteazlarının salınmasına da neden olur. Bu proteazlar, kompleman sistemiyle etkileşerek $\text{C}_{5a} - \text{C}_{3a}$ gibi nötrofiller için potent kemotaktik ajanları oluştururlar ⁽⁵⁰⁾.

Bir çok çalışmada ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, tungsten) kullanılarak iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarının azaltılabildiği gösterilmiştir ⁽³⁶⁾.

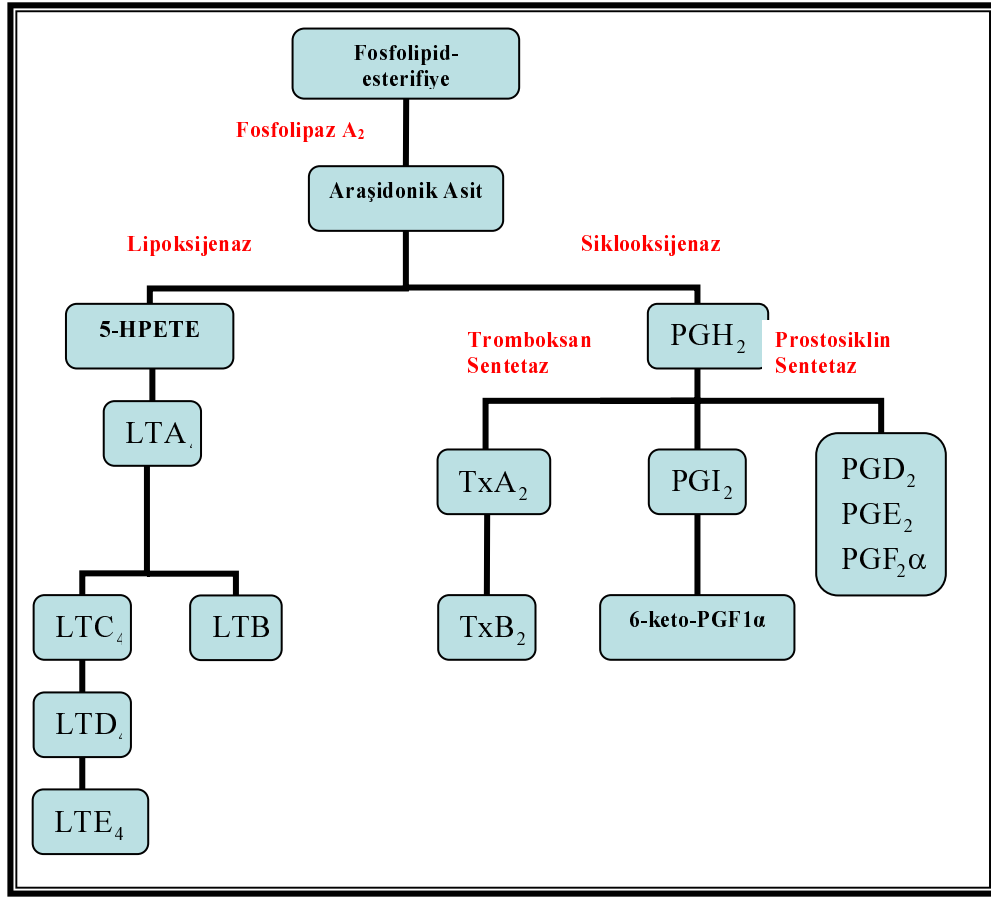


Şekil 3. İskemi-reperfüzyon sırasında XO sistemi ile SOR oluşumu.

Araşidonik Asit Ürünlerinin Oluşumu

İskemik dokunun reperfüze olmasından sonra fosfolipaz A₂ aktive olarak araşidonik asit ürünlerini oluşturur. Araşidonik asit, lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri ile prostoglandin, prostasiklin, tromboksan, lökotrien gibi biyolojik olarak aktif ürünlere dönüştürülür ⁽⁵⁹⁾. Tüm bu ürünlerin farklı etkilere sahip olmakla birlikte iskemi-reperfüzyon hasarında nötrofillere olan etkileri açısından önemlidirler. Nötrofilleri 3 yoldan etkilerler:

1. Güçlü birer kemoatraktan rolü oynayarak nötrofil akümülyasyonunu sağlayıp endotele nötrofillerin adezyonunu artırırılar. LTB₄ ve TxA₂ oldukça güçlü kemoatraktanlardır ⁽⁴⁷⁾.
2. Araşidonik asit ürünleri, nötrofilleri aktive ederek daha fazla oksijen radikali ve proteolitik enzim üretmelerine neden olurlar. LTB₄ nötrofillerden H₂O₂ ve elastaz salınımını artırıp, nötrofillerin endotelden geçişini uyarır. TxA₂ ise, iskemi ve reperfüzyon sonrasında nötrofilleri aktive ederek H₂O₂ üretimini uyarır ⁽⁶⁾.
3. Lökotrienler ve tromboksanlar, ayrıca, mikrovasküler yatağa doğrudan vazokonstrüktör etki yaparak reperfüzyon sonrasında kötü kapiller akıma yol açarlar ⁽⁶⁾.



Şekil 4. Araşidonik asit metabolizması

Nötrofillerin Aktivasyonu ve Hasarlı Dokuya Göçü

İskemik dokuda reperfüzyon sağlandığında hasarlı dokudan salınan araşidonik asit metabolitlerinin yanı sıra çeşitli sitokinler ve adezyon molekülleri nötrofillerin aktive olarak endotele tutunup, dokuya invaze olmasını kolaylaştırır.

Sitokinler

Sitokinler bir grup polipeptid mediatördür. Normal homeostazda yer almamakla birlikte pek çok hastalığın fizyopatolojisinde önemli işlevlere sahiptirler. TNF α ve IL-1 sitokinlerin başlıcalarıdır. TNF α , serbest oksijen radikallerinin ve bunların metabolitlerinin oluşumunu sağlayarak, vasküler endotelin nötrofil aracılı saldırıya karşı duyarlılığını artırır.

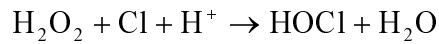
Endotel hücreleri, $\text{TNF}\alpha$ 'nin etkisi ile inflamatuvar medyatörlerden IL-1 ve PAF salgılar ⁽⁹⁾. IL-1, nötrofillerin inflame dokularda damar dışına çıkmalarına neden olan oldukça güçlü ajanlardan biridir. PAF da aynı şekilde nötrofillerin adezyonunu kolaylaştıran etkin bir ajandır ⁽⁵⁰⁾. Bu sitokinler sistemik inflamatuvar yanıt oluşturarak nötrofillerin toplanmasını ve aktivasyonunu sağlayıp, iskemi-reperfüzyon sonrası doku hasarına neden olur.

Adezyon Molekülleri

Aktive nötrofillerin endotele yapışmasında çeşitli adezyon molekülleri rol oynarlar. Adezyon molekülleri selektinler, integrinler ve immünglobulinler olarak üçe ayrılırlar ⁽³²⁾. Özellikle selektinler ve bir nötrofil glikoprotein kompleksi olan CD11/CD18 B₂ integrin, nötrofillerin aktive endote ilk adezyonlarını ve sıralanmalarını sağlarlar ⁽³³⁾. Bu olayları daha sonra diapedez ve ekstrasvasküler dokuya göç izler ⁽⁴⁶⁾.

Aktive Nötrofiller

Aktivasyonları ile birlikte nötrofillerde bulunan NADPH oksidaz enzimi moleküler oksijeni süperoksit radikaline redükler. Oluşan süperoksit, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla hidrojen peroksit'e dönüşür. Ayrıca aktive nötrofillerden salınan MPO, hidrojen peroksit ve klor iyonundan hipoklorik asit oluşumunu katalizler ^(18,56).



Hipoklorik asit, hidrojen peroksitten yaklaşık yüz kat daha fazla reaktif bir oksidan ve klorlayıcı bir ajandır. Ayrıca primer aminlerle de reaksiyona girerek N-kloraminleri oluşturur. Oluşan bu toksik maddeler doku hasarına yol açarlar. Aktive nötrofiller proteaz yapısında enzimler (elastaz, kollojenaz, vs) salarak da doku hasarına katkıda bulunurlar ⁽⁵⁰⁾.

Myeloperoksidaz (MPO) Enzimi'nin Önemi

MPO, aktive nörofillerin azurofilik granüllerinde bol miktarda bulunan lizozomal bir enzimdir. Monosit ve makrofajlarda çok az bulunur veya hiç bulunmaz. Bu yüzden MPO aktivitesinin ölçümü dokuya nötrofillerin toplanmasını göstermede oldukça yararlıdır ⁽²⁾. Bu da iskemi-reperfüzyon hasarında nötrofil infiltrasyonunun indirekt olarak belirlenmesine olanak sağlar.

Serbest Radikaller

Serbest radikallerle, özellikle reaktif oksijen türevleri ile oluşturulan zedelenme, hücre hasarının önemli bir mekanizmasıdır. Serbest radikal hasarı çeşitli kimyasal maddeler, iyonizan radyasyon (x-ışınları ve γ -ışınları), oksijen ve diğer gazlardan zehirlenme, anestezi maddeler, kimyasal etkileşimlerinde metalleri (Fe, Cu) kullanan antibiyotikler, antineoplastik ajanlar, aromatik hidrokarbonlar gibi dış etkenler nedeniyle olabileceği gibi; fagositik hücreler ile enfeksiyöz ajanların öldürülmesi, inflamatuvar hücre hasarı, makrofajlar ile neoplastik hücre imhası, hücre yaşlanma, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi endojen mekanizmalardan da kaynaklanabilir ⁽³⁹⁾.

Serbest radikal, en dış orbitalinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren atom veya moleküldür. Paylaşılmayan elektronlar bir atom veya molekülün kimyasal reaktivitesini değiştirerek onu radikal olmayan karşılığından daha reaktif hale getirmektedir ⁽⁴⁴⁾. Çiftlenmemiş elektrona sahip atom veya molekül elektronunu bir başka moleküle vererek veya ondan elektron alarak daha stabil hale gelme eğilimindedir. Bundan dolayı organik ve inorganik kimyasallar ile kolaylıkla reaksiyona girer. Serbest radikaller hücrede membran proteinleri ve nükleik asitler ile etkileşerek onları parçalarlar ve otokatalitik reaksiyonları

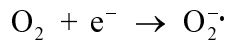
başlatırlar. Serbest radikal ile reaksiyona giren moleküller de serbest radikallere dönüşerek, hasar zincirini ilerletirler ⁽³⁹⁾.

Hücrede normal fizyolojik olaylar sırasında gerçekleşen redüksiyon-oksidasyon (redoks) reaksiyonları esnasında da serbest radikaller oluşur. Mitokondriyal elektron transportu, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri, araşidonik asit metabolizması, endojen ve eksojen substratların otooksidasyonu, peroksizomlar, geçiş metalleri (Fe, Cu), enzimler, proteinler ve oksidatif stres yapan durumlar hücre içerisinde serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olan kaynaklardır ^(8,18).

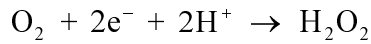
Hücre homeostazı korunduğu sürece canlı hücreler serbest radikallerle başa çıkabilirler. Ancak iskemi-reperfüzyon hasarı gibi hücre homeostazını bozan durumlarda hücre serbest radikallerle başa çıkamaz yada koruyucu sistemler yetersiz kalır.

Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu

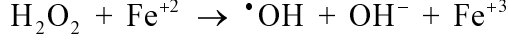
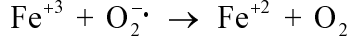
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen radikalleridir. Tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalini oluşturur ⁽²¹⁾.



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur.



Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Çünkü Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi geçiş iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanıp çok toksik olan hidroksil ($\cdot OH$) radikalini oluşturur. Hücre içerisinde serbest olarak bulunan demirin çoğu ferrik (Fe^{+3}) formda olduğu için önce ferröz (Fe^{+2}) forma indirgenmelidir. Bunun için de süperoksit radikali kullanılır.



Burada ifade edilen reaksiyon demir katalizli Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonları olarak bilinir.

Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Biyolojik sistemlerde oksijeni kullanan canlılarda en kolay ve en fazla oluşan ilk oksijen radikali süperoksit anyonudur. Canlılarda mitokondriler ve endoplazmik retikulumdaki elektron transport zincirinden sızan elektronlar başlıca süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) kaynağını oluştururlar. Ayrıca aktif fagositlerden, çeşitli hücrelerin özgül fonksiyonları sırasında ve çeşitli moleküllerin oto-oksidasyonu sırasında da süperoksit üretilmektedir. Süperoksit, serbest radikal olmasına karşın hasar oluşturucu bir tür değildir. Asıl önemi, hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının redükleyicisi olmasıdır ^(21,28,29).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

İki süperoksit anyonunun spontan yada enzimatik olarak katalizlenmesi sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Okside edici bir ajan olmasına karşın serbest radikal değildir. Asıl önemi, geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini ($\cdot\text{OH}$) oluşturmasıdır. Metal katalizörlerin yokluğunda süperoksit ve hidrojen peroksit kolaylıkla uzaklaştırılır ve zararsız hale getirilir ⁽²⁸⁾.

Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$)

Bilinen en reaktif serbest radikallerdendir. Hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen, yüksek aktivitesi olan bir ajan olmasına karşın yarılanma ömrü çok kısadır (10^{-9} saniye) ⁽¹³⁾. Bundan dolayı reaksiyona girmeden önce hücrede difüze olması güçtür. Fakat küçük miktarları bile üretildiği yerde aşırı hasar yapabilecek kapasitededir. Yağ

asitleri, proteinler, DNA, karbonhidratlar ve genel olarak tüm organik moleküllerden bir elektron kopararak yıkımlarına ve tekrar radikal oluşumuna neden olur^(8,13,44).

Singlet Oksijen ($\cdot\text{O}_2$)

Bir radikal olmayıp, sıklıkla serbest oksijen radikalleriyle birlikte anılan reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonlarıyla üretilebilir⁽⁵¹⁾.

Karbon Merkezli Radikaller ($\text{R}\cdot$)

Lipid, nükleik asit, karbonhidrat veya protein gibi biyolojik bir molekülü okside edici bir radikalın (Örneğin $\text{OH}\cdot$) etkilemesiyle oluşurlar. Bunlar, peroksil radikallerini ($\text{ROO}\cdot$) oluşturmak üzere oksijen molekülü ile çok hızlı bir şekilde birleşirler. Diğer taraftan bu peroksil radikalleri, alkoksil radikalleri ($\text{RO}\cdot$) üreten reaksiyonlara karışabilirler. Sülfür atomları da yeni bir serbest radikal üretimi (tiyo radikaller, $\text{RS}\cdot$) için kaynak olabilir⁽²⁸⁾.

Serbest Radikallerin Hücre Yapılarına Olan Etkileri

Hücre içerisinde serbest radikaller genel olarak membran lipidleri, DNA, proteinler ve karbonhidratlar ile etkileşerek çeşitli basamaklarda hücre hasarına neden olurlar.

Membran Lipidlerine Olan Etkileri

Hücre membranları, poliansature yağ asitlerinden (PUFA) zengindir. PUFA'lar serbest radikaller ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. PUFA'ların oksidatif yıkımı, sonucunda zincir reaksiyonları başlar. Sonuçta oluşan peroksil radikalleri ($\text{LOO}\cdot$) zincir reaksiyonunun bir parçası olup, bir sonraki PUFA'yı okside ederek yeni zincir reaksiyonlarını başlatır. Bu işlemlerin sonucunda oluşan ürünler hidroperoksitlerdir (LOOH) ve bunlar da daha şiddetli radikal özelliği olan türlere, özellikle aldehitlere çevrilirler. Aldehitler daima lipid hidroperoksitler parçalandığı zaman oluşur ve çoğu biyolojik olarak aktiftir. Bu bileşikler normal olarak oluştukları yerden difüze olup, hücrenin diğer bölgelerinde hasar yapabilme özelliğine sahiptir^(44,49).

MDA'nın Önemi

Üç ve daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonun sonucunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) ortaya çıkar. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir indikatörü olmamakla birlikte, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir ⁽¹⁰⁾. Lipid peroksidasyonuna bağlı MDA birikimi daha çok reperfüzyon fazında gelişen hasarın önemli bir komponentidir. MDA; membran komponentlerinde polimerizasyon ve çapraz bağlanmalara, iyon transportuna, enzim aktivitesini değiştirerek iç membranın özelliklerinde değişikliklere neden olarak membran permeabilitesi ile mikroviskozitesini ciddi şekilde etkiler ^(5,10).

Protein ve Nükleik Asitlere Olan Etkileri

Protein ve nükleik asitler serbest radikal hasarına membran lipidlerinden daha az duyarlıdır. Bu yapılarda serbest radikaller kolaylıkla zincir reaksiyonu oluşturamazlar ⁽⁶⁾.

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenmesi aminoasit içeriklerine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikaller ile reaktivitesi yüksek olduğu için; tirozin, triptofan, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler ⁽¹⁵⁾.

DNA, okside edici radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilir. Aktif nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 , membranlardan geçerek nükleusda DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir. Hidroksil radikali purin ve pirimidin bazlarına saldırarak mutasyona yol açabilir; ancak kısa yarılanma ömürlerinden dolayı sadece DNA'ya yakın yerlerde oluştuklarında bu etkiyi gösterebilirler ⁽¹³⁾.

Karbonhidratlara Olan Etkileri

Glukoz ve mannoz gibi monosakkaritlerin oto-oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler, okzaldehitler oluşabilir. Okzaldehitlerin, DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstermeleri kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynar ⁽²³⁾.

Antioksidan Savunma

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin yıkımını önleyen veya bu yıkımın etkilerini kısmen düzeltebilen antioksidan mekanizmalar vardır. Radikallerin detoksifikasyonu, oluşumlarının önlenmesi ve/veya sınırlandırılması olarak farklı şekillerde koruma sağlanmaktadır. Vücutta endojen antioksidan mekanizmalar enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılabilir.

Enzimatik Olmayan Anti-Oksidan Mekanizmalar

Bu grup içerisinde gerek hücre içerisinde gerekse hücre dışında etkili olan bir çok endojen madde bulunur. Değişik mekanizmalar ile anti-oksidan özellik gösteren bu yapıların başlıcaları şu şekilde sıralanabilir:

E vitamini (Tokoferol): Lipofilik yapıda olup, membranlar ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Lipid peroksitlerini inaktive eder ve peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonunu önler. Anti-oksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında artar ⁽³⁵⁾.

C vitamini (Askorbik Asit): Hidrofilik yapıda olan bu vitamin hücre dışı sıvılarda bulunur. Güçlü bir redükleyici ajan olup, süperoksit ve hidroksil radikallerinin doğrudan temizleyicisidir ⁽¹⁴⁾.

β -Karoten: Vitamin A öncülü olup, lipofilik özelliği nedeniyle membranlarda bulunur. Düşük oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Peroksit radikallerinin dokularda hapsedilmesinde rol oynar ⁽³⁵⁾.

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

Albümin: Geçiş metallerini bağlar. Lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır ⁽³⁾.

Seruloplazmin: Ferro demiri yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece serbest radikal oluşumunu inhibe eder ⁽¹⁴⁾.

Ürik asit: İnsanlarda normal plasma konsantrasyonu olan 400mg/dl konsantrasyonunda süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini temizler ⁽¹⁵⁾.

Bilirubin: Lipofiliktir ve membranlarda kolaylıkla birikir. Süperoksit ve hidroksil radikallerini toplar ⁽¹⁵⁾.

Glutasyon: Karaciğerde, glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarını da redükte halde tutarak oksidasyondan korur ⁽³⁷⁾.

Sistein : Serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır ⁽¹⁵⁾.

Taurin: Ksenobiyotiklere bağlanır. Hipoklorit ile reaksiyona girer.

Glukoz: Hidroksil radikali tutucusudur.

Piruvat: H₂O₂ tutucusudur.

Melatonin: Pineal bezden salınan bir hormon olup hidroksil radikalini ortadan kaldıran etkin bir antioksidandır ⁽⁴⁸⁾.

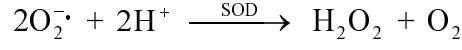
Haptoglobulin: Serbest hemoglobini bağlar ⁽¹⁵⁾.

Hemopeksin: Serbest hemi bağlar ⁽¹⁵⁾.

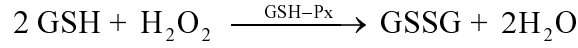
Enzimatik Anti-Oksidan Mekanizmalar

Süperoksit dismutaz (SOD): Metal ihtiva ettiği için metalloenzim grubundadır. Enzim, hücrenin birçok farklı yerinde bulunur. Sitozolik enzim, birbirine benzer iki alt birimden kurulu olup bu alt birimlerin her biri, bir ekivalan Cu⁺² ve Zn⁺² içerirken, mitokondriyal enzim Mn⁺² içerir. SOD bütün temel aerobik dokularda bulur ⁽³⁴⁾. Organizmada oluşan

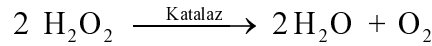
süperoksit anyonu ilk olarak SOD enzimi ile moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüştürülür:



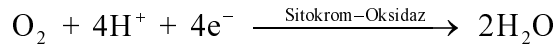
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Prostetik grup olarak Selenyum (Se) taşıyan bir metalloenzimdir. Glutasyon tripeptidini (GSH) oksitlenmiş şekline çevirerek, sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 'i uzaklaştırır. Ayrıca lipid peroksidlerinin indirgenmesini katalizler ⁽²¹⁾.



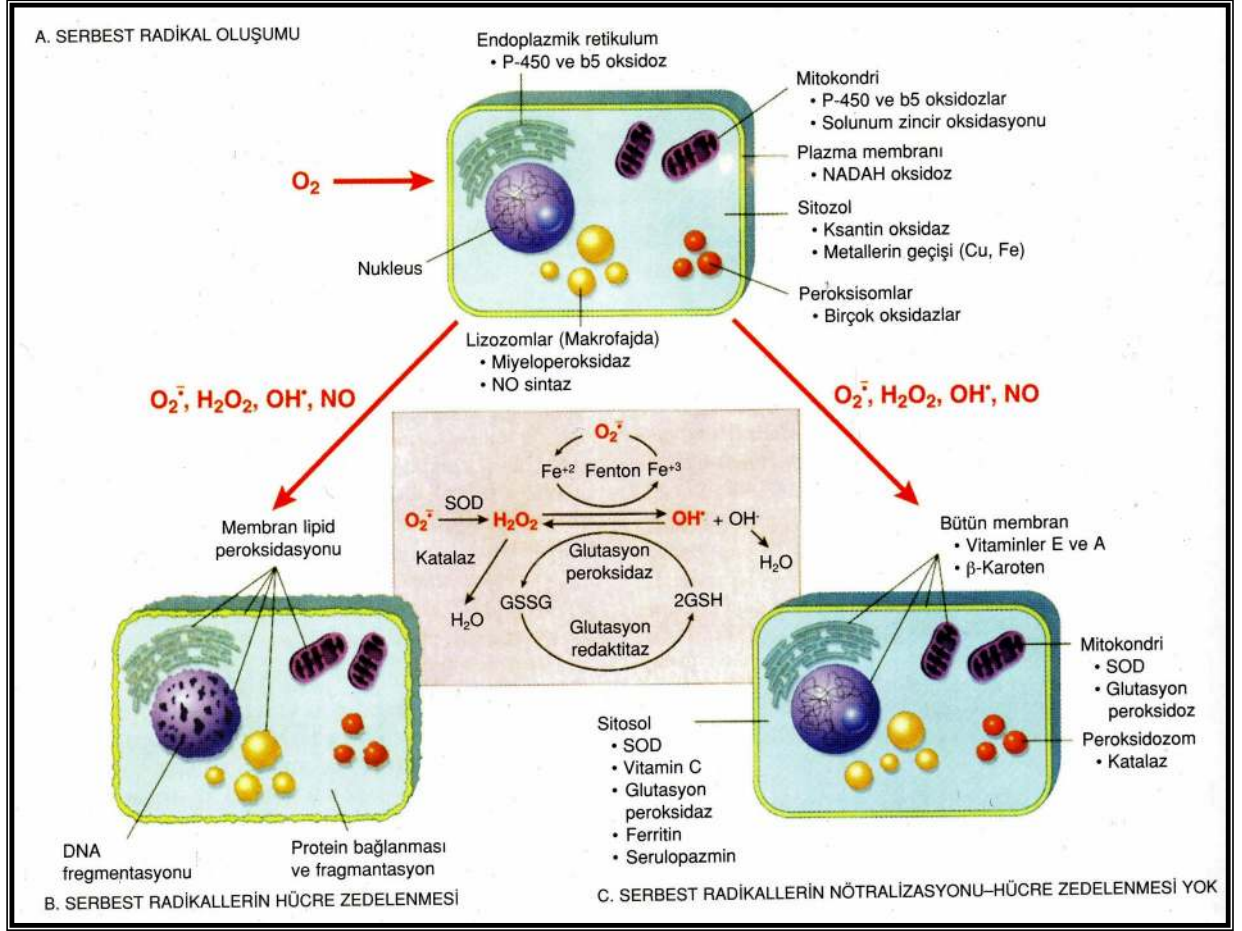
Katalaz: Prostetik grup olarak Hem (protoporfirin IX) bulunduran bir enzimdir. Bütün dokularda değişik konsantrasyonda bulunmakla birlikte en yüksek aktivitesi karaciğer ve böbrekte saptanmıştır. Hücre içerisinde özellikle peroksizomlarda bulunur. Oksidazların aktivitesi ile oluşan H_2O_2 'i direk olarak suya çevirir. Özellikle H_2O_2 konsantrasyonunun aşırı arttığı ortamlarda aktivite gösterir ⁽¹⁾.



Mitokondrial Sitokrom Oksidaz: Prostetik grup olarak Hem bulundurur. Mitokondrial solunum zincirinin son enzimidir. Süperoksit anyonunu detoksifiye ederek son ürün olarak su oluşturur.



İskemi-reperfüzyon hasarında oluşan serbest radikallerle başa çıkmak için bahsedilen anti-oksidan sistemlerin yanı sıra birçok biyolojik etkinliği olan ajan ve enzim sistemleri araştırma konusudur. Son yıllarda hem-oksijenaz sistemi ve bu enzim sisteminin hem indükleyicisi hem de substratı olan hemin araştırılan konulardan bir tanesidir.



Şekil 5. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu (A), hücrede yaptıkları hasar (B) ve hücre içi antioksidan sistemler (C) ⁽³⁹⁾

2.3 HEMİN ve HEMOKSİJENAZ SİSTEMİ

2.3.1 HEMİN

Hem, ferröz demir içeren protoporfirin IX'dur. Hematin, ferrik demir ve demirin altıncı bağlanma noktasında su molekülü bulunan 'hem'in okside formudur. Hemin ise hematinin klorid formudur; su yerine demire bağlı bir klorid iyonu bulunur. Normalde in vivo şartlarda bulunan form hemindir ⁽¹⁵⁾.

Hem, aerobik yaşantının devamlılığı için vazgeçilmez bir yapıdır. Hem proteinleri, oksijen transportunun ve redoks reaksiyonlarının düzenlenmesini kolaylaştırır. Bununla birlikte, oksidatif hasarı katalizleme potansiyeli vardır ve biyolojik sistemlerde serbest bulunduğunda tehlikeli olabilir ⁽³⁾.

Hidrofobik özelliğinin fazla olması nedeniyle, nonpolar solüsyonların içine çok çabuk yayılır. Böylece sağlam hücre duvarlarının hidrofobik ortamlarında kolayca konsantre olabilir. Membran içerisinde hemin; (a) zararlı oksidasyon reaksiyonlarına doğrudan aracılık edebilir veya (b) oksidatif yıkıma uğrayarak yağ asitleri, proteinler ve nükleik asitler gibi bir çok biyolojik maddenin Fenton reaksiyonu aracılığıyla oksidatif hasarını katalizleyen serbest demirin salınmasına neden olur ^(3,15,20,26,31).

Hemin, çok küçük miktarlarda bile reaktif oksijen radikallerinin meydana getirdiği hasarı fazlasıyla artırır. Özel bir hemin bağlayıcı protein olarak hemopeksin önemli bir plazma unsurudur. Yeterli miktarda hemopeksin bulunduğu takdirde, hidrojen peroksit ve uyarılmış nötrofillerin provoke ettiği, artmış hemine bağımlı sitotoksisiteyi inhibe eder. Heminin arttırdığı oksidatif endotelial hasarı azaltan tek plazma faktörü hemopeksin değildir. Seruloplazmin, katalaz, albumin ve diğer faktörler de önemli koruyuculardır ^(3,4,43).

Vücutta en önemli hemin kaynağı hemoglobindir. Normal şartlar altında alyuvarlardan açığa çıkan hemin miktarı önemsizdir, çünkü hem ve globin arasındaki bağ çok güçlüdür.

Hemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu hem-globin etkileşimini zayıflatır ve heminin artmış salınımı ile sonuçlanır. Hemin çok hidrofobik olduğu için membran yapıları ile yakın ilişkidir. Normalde eritrosit içerisinde ortaya çıkan hemin, eritrosit membranına katılır, buradan yukarıda bahsedilen bağlayıcı yapılarla karaciğere taşınır. Çok miktarda stabil olmayan hemoglobinin bulunduğu hemoglobinopati, DIC, TTP gibi durumlarda, plazmada çok miktarda serbest hemin açığa çıkar. Dolaşımdaki hemoglobinin %1'den fazlası serbestlendiğinde, plazmadaki hemopeksin ve albümin gibi bağlayıcı proteinlerin taşıma kapasitesinin üstüne çıkar. Bu durumda hemin hücre membranlarında birikip, membran bütünlüğünü hızla bozarak hücre yıkımına neden olur. Hemin toksisitesinin altında yatan detaylı mekanizma halen açık değildir; ancak mevcut veriler serbest heminin, çok miktarda ortaya çıktığı durumlarda ciddi anlamda toksik olduğunu göstermektedir ^(4,7,15,26).

Serbest heminin hücre membranlarına girişi, birçok klinik durumun gelişiminde önemli olabilmektedir. Bunlar; (a) intravasküler hemoliz veya myoglobinemiye bağlı akut böbrek yetmezliği, (b) reaktif demir salınımının gösterildiği iskemi-reperfüzyon hasarı, (c) serum hemopeksininin neredeyse hiç olmadığı prematürlerin retrolental fibroplazisinde ortaya çıkan retinal dolaşımın hiperoksik yıkımı, (d) hematin infüzyonu yapılan akut intermitant porfiryalı hastalarda oluşan vaskülopati ve (e) ateroskleroz'dur ⁽³⁾.

Serbest heminin düşük konsantrasyonlarda olsa dahi ortamda hidrojen peroksit veya aktive nötrofillerin varlığında toksisitesinin kat kat arttığı gösterilmiştir. Ortamda az miktarda oksijen ve indirgeyici bir ajan bulunduğunda, hemin membran lipidlerinin yanı sıra DNA ve proteinler üzerine de ciddi toksisite sergileyebilir ⁽¹⁵⁾. İskemi-reperfüzyon tablosunda hidrojen peroksit ve aktive nötrofillerin bulunmasından dolayı hemin hücreye ciddi toksik etkiler gösterebilir.

Heminin peroksitler varlığında artan toksik etkisinin ürik asit varlığında inhibe edilebileceği gösterilmiştir. İnsanlarda plazma ürik asit konsantrasyonu yaklaşık olarak 400µM düzeyinde olup, interstisyel sıvıda da benzerdir. Heminin H₂O₂ varlığında sitolitik aktivitesinin, 300 µM ürik asit varlığında %97 inhibe olduğu gösterilmiştir. Heminin aktivitesi ürik asitin etkisinin yanı sıra, tirozin ve triptofan ile de - hatta bu amino asitler bir peptidin yapısında olsalar bile - kuvvetle inhibe olur⁽¹⁵⁾.

Heminin toksik etkilerini gösterdiği ikinci mekanizma, oksijen ve indirgeyici bir ajan varlığında gerçekleşir. Bu aktivite ürik asit, tirozin ve triptofan tarafından ya hiç yada çok az inhibe olur. Sonuç olarak, bu ikinci mekanizmanın etkin bir inhibisyonu yoktur⁽¹⁵⁾.

Hemin gerek serbest halde gerekse methemoglobinin yapısında bulunurken, plazmada bol miktarda bulunan LDL'nin oksitlenmesinde de önemli bir role sahiptir. LDL'yi oksitleyerek endotele toksik maddelerin oluşmasını katalizler. Yakın zamanda, heminin aterogenez gelişiminde rol oynayan lipoprotein oksidasyonunun kuvvetli bir indükleyicisi olduğu bildirilmiştir.^(4,25,43) Hemin bir kez LDL içerisine yerleştikten sonra, az miktarda lipid hidroperoksit (LOOH) oluşumunu da içeren spontan oksidatif reaksiyonlar, hem grubunun oksidatif lizisine yol açar ve hem demirinin LDL partikülü içerisine salınmasını sağlar. Böylece salınan bu demir, heminin oksidatif yıkımını ve poliansatüre yağ asitlerinin ve LDL partikülünün diğer komponentlerinin oksidasyonunun hızlanmasını katalizler. LDL içerisinde α-tokoferolün tükenmesi konjuge dienlerin, lipid hidroperoksidazlarının ve TİBARS'ların formasyonunu takip eder⁽⁴⁾. Hemin ve LDL içeren inkübasyonlara demir şelatörü olan desferroksamin eklenmesi, hemin kaybını ve LOOH gibi oksidasyon ürünlerinin ortaya çıkışını önler^(4,25,42).

Hemin, hücre içerisinde nükleik asit ve proteinlerle etkileşerek yapılarını bozar. Bu nedenle karsinogeneze de yol açabileceği düşünülmektedir. Pierre ve ark. hemoglobin ve

hemin verilen düşük kalsiyum diyetindeki ratlarda, kolorektal karsinogenezis gelişiminin arttığını göstermişlerdir. İnsanlarda yapılan yeni çalışmaların sonuçları, diyetle hemin demirinin alınmasının, özellikle alkolik kadınlarda proksimal kolon kanseri ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Et, alkol ve ferröz demirin bağırsakta serbest radikallerin, özellikle reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırdığından şüphelenilmektedir. Hemoglobin ve hemin (okside hem), kolon hücrelerinde DNA hasarına neden olsa da sonuçlanan genotoksitenin oksidatif stres gelişimi ve serbest radikal formasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir ⁽¹⁹⁾.

Hemin her ne kadar yaşam için gerekli bir yapı olsa da, serbest halde bulunduğu ne kadar toksik olduğu ortadadır. Ancak organizmanın bu toksisite ile baş edebilmek için geliştirdiği önemli savunma mekanizmaları vardır. Bunlardan en önemlisi hemoksijenaz sistemidir ki, heminin parçalanarak ortadan kalkmasını sağlar. Bu enzim sisteminin en önemli indükleyicisi de heminin kendisidir.

2.3.2 HEMOKSİJENAZ ENZİM SİSTEMİ ve YIKIM ÜRÜNLERİ

Heminin hidrofobik oluşu vücuttan hızla uzaklaştırılmasını önler. Bu nedenle hemin toksisitesine karşı en iyi savunma mekanizması, hızla yıkılması olacaktır ⁽¹⁵⁾.

Memeli hücrelerinde oksidatif strese karşı yanıt olarak hem oksijenaz (HO) enzim sistemi bulunmuştur ⁽³⁾. HO sistemi hücrelerin endoplazmik retikülümüne yerleşmiştir ⁽²⁷⁾. Hem-oksijenaz hem parçalayan bir enzim olarak porfirin halkasını açar, biliverdin ve karbon dioksit üreterek demiri salıverir; oluşan biliverdin de biliverdin redüktaz ile bilirubine dönüştürülür ^(7,8,15,25). Bu sistem HO-1, HO-2 ve HO-3'ü içeren üç adet izoenzimden oluşmaktadır ⁽²⁷⁾.

HO-1 32.8 kDa'luk bir stres proteini olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda heat shock protein 32 (HSP-32) olarak da adlandırılmaktadır ve transkripsiyonel olarak hemin, oksidanlar

ve sitokinler gibi bir çok ajan tarafından indüklenebilir özelliğindedir ^(22,25). HO-1 aktivitesi, hemin yıkımında predominant mekanizmadır ve vücutta yaygın olarak bulunur ⁽²⁷⁾.

HO-2'nin termal ve oksidatif strese cevapsız, HO'nun konstitütif olarak eksprese olan formu olduğuna inanılmaktadır. Bununla birlikte HO-2'nin adrenal glukokortikoidler, doku hasarı ve spinal kord hasarı gibi değişik agonistler ile uyarılabildiğine dair yeni işaretler vardır ^(7,27). HO-2 esas olarak santral nöronlarda eksprese olmasıyla birlikte testislerde de bulunur ^(7,22).

HO-3 yakın zamanda bulunan bir izoenzim olarak, zayıf hemin katalizleme aktivitesine sahiptir ⁽²⁷⁾. HO-3 rodentlerde halen araştırılmaktadır. İnsan hücrelerinde bulunmadığını savunan görüşler mevcutsa da ⁽⁴⁾, santral nöronlarda az miktarda bulunduğu dair görüşler de vardır ⁽²²⁾.

Heminin HO-1 ile yıkımının sonucunda toksik etkisi ortadan kalksa da ortaya çıkan bilirubin, CO ve serbest demir hücre homeostazını etkileyen çeşitli sonuçlar doğurur. Bunların kimileri faydalı, kimileri de zararlı etkilidir. Yıkım ürünlerinin etkileri gözden geçirilecek olursa;

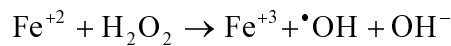
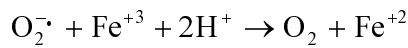
Bilirubin'in etkin bir antioksidan olduğu ve lipid peroksidasyonunu kuvvetle inhibe ettiği gösterilmiştir ⁽⁴⁾. Diğer başka yayınlar da fazla miktardaki bilirubinin toksik etkilere yol açabileceğini bildirmektedir. Bilirubin in vivo şartlarda çok fazla oluştuğunda ciddi derecede toksik olabilir. Bilirubin de suda çözünmez özelliğindedir ve vücuttan difosfoglukuronat ile konjuge edilerek atılır. ⁽¹⁵⁾. Ayrıca ekzojen bilirubinin hemin aracılı sitotoksiteyi azaltmadığı dikkate değerdir ^(7,54).

Karbon monoksit (CO)'in iskemide düz kas relaksasyonu sağladığı, platelet agregasyonunu inhibe ettiği ve inflamatuvar kaskadı sınırlayarak anti-inflamatuvar etki gösterir ^(12,40,54).

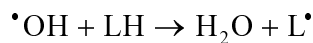
Serbest demir: Canlı hücrelerde, yaşam ve ölümün temelinde paradoks olarak demir-oksijen bağlantısı yatmaktadır ⁽⁴⁵⁾. Demir, ferrik (Fe^{+3}) ve ferröz (Fe^{+2}) formlar arasında değişerek, elektron alma ve verme kapasitesine sahiptir. Bu kapasitesi demiri sitokrom enzimleri, oksijen bağlayan proteinler (örn; hemoglobin, myoglobin) ve bazı enzimlerin yararlı bir komponenti yapar. Demir-sülfür kümeleri ve demir-protoporfirin (örn; hem) bu enzimlerin kofaktörleridir ⁽¹³⁾. Ancak dokularda demir akümüasyonu (özellikle labil demir havuzu arttığında), doku hasarına yol açar. Demir, serbest radikal oluşumunun ve sonrasında lipid peroksidasyonunun etkin bir katalizörüdür. Bu da demir bağımlı hücre hasarının patofizyolojisinin temel mekanizmasıdır ^(8,58).

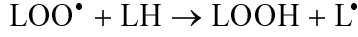
Hemin yıkım ürünlerinden olan serbest demir, oksijen radikallerinin oluşmasına aracılık ederek doku hasarından sorumlu olabilir. Heminden salınan serbest demir, hem-oksijenaz enzim aktivitesiyle oluşabileceği gibi hidrojen peroksit varlığında spontan olarak da ortaya çıkabilir. Serbest demirin toksisitesinin temeli, hidrojen peroksitin süperoksit varlığında Fenton reaksiyonu ile daha toksik olan hidroksil radikallerine dönüşmesidir ^(4,8,15).

Salınan herhangi bir demir, sitrat veya adenosin difosfat gibi hücre yapılarıyla hızla şelasyona uğrar. Ardından bu “serbest demir” veya “labile demir” Haber-Weiss kimyasında yer alarak, hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) oluşumunu katalizler ^(13,15,20):

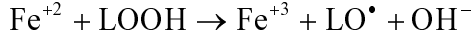


$\cdot\text{OH}$, poliansature yağ asitlerinden (LH) bir hidrojen atomu alarak lipid peroksidasyonunu başlatma kapasitesine sahiptir ^(13,15):





Bir kez lipid hidroperoksitleri (LOOH) ortamda biriktiği zaman, serbest demir direkt olarak ek lipid peroksidasyonunu başlatabilir ^(13,15):



Sonuç olarak “serbest demir”, hücre içerisinde aşırı miktarda bulunduğu veya inflamatuvar reaksiyonlarda ve reperfüzyon hasarında olduğu gibi süperoksitlerin fazla üretildiği durumlarda, oksidatif strese önemli bir rol oynar ⁽¹³⁾.

Bu hücre hasarını önlemek için de hücreler intraselüler demir konsantrasyonunu metabolik ihtiyaçlarına yetecek düzeyde; ancak toksisite sınırının altında tutmak için sistemler geliştirmişlerdir ⁽⁴⁵⁾. Hücre içi serbest demir toksisitesinin en iyi koruyucusu ferritindir.

2.3.3 FERRİTİN ve HÜCRE İÇİ SERBEST DEMİR REGÜLASYON SİSTEMLERİ

Ökaryotik hücrelerin çoğunda demir 450-500 kDa’luk bir sitozolik protein olan ferritine bağlı olarak bulunur. Ferritin, hücrelerin vital fonksiyonlarının devamlılığı için demir rezervi olarak görev yapmasının yanında, demiri toplayarak, olabilecek zararlı oksidatif reaksiyonları önler. Bu protein, doku tipine ve demir kaynağına bağımlı olarak 24 adet H ve L alt ünitenin (ağır ve hafif zincir) değişik kombinasyonlarının bir araya gelmesinden oluşur ve çok yüksek demir depolama kapasitesine sahiptir. Ferritin heteropolimeri, ferrihidrit bir kor yapısında 4500 adet demir iyonunu barındırabilir (4500 mol Fe/mol ferritin) ^(4,25,31). Ferritin, demiri katalitik olarak daha düşük aktiviteye sahip bir forma dönüştürmesiyle hemine karşı çok önemli bir savunma sağlar ⁽²⁶⁾.

Ferritinin ağır zinciri (H) ferroksidaz aktivitesi göstererek, aerobik şartlarda ferröz demirin (Fe⁺²) ferrik demire (Fe⁺³) oksidasyonunu katalizler. Hafif zincir (L) ise kor agregatı oluşturarak biyolojik sistemlerde intraselüler demir depolanmasını sağlar. Demir aracılı

ferritin sentezi, primer olarak post-transkripsiyonel/translasyonel modülasyon ile regüle edilir (4,31).

Ökaryotik hücrelerin büyümesi ve metabolizması için gerekli olan demirin çoğu diferrik yapıda olan transferrinden sağlanır. Bununla birlikte hemin ve diğer birçok şelat da demir sağlamakta ve bu yolla ferritini uyarmaktadır. “Iron responsive protein”ler olan IRP-1 ve IRP-2 ferritinin translasyonel regülasyonu ve transferrin reseptörü sentezinde anahtar roledirler. IRP-1, ortamda demirin az olduğu durumda (aktif form) H veya L-ferritin mRNA üzerindeki “iron-responsive element”e (IRE) sıkıca bağlanarak translasyonunu önler. Aksine, IRP-1 ortamda demirin fazla olduğu durumda (inaktif form), fonksiyonel sitozolik akonitaz olarak belirlenmiştir ve IRE’den ayrılarak translasyonun gerçekleşmesine izin verir. IRP-2 de benzer şekilde fonksiyon görür ama IRP-1’den farklı olarak, demirin fazla olduğu durumdaki formu çabucak proteolitik yıkıma uğrar. IRP’ler aynı mekanizma ile hücre yüzey reseptörü olan transferrin reseptörlerinin de regülasyonunu sağlarlar. Reseptör translasyonunu hücre içi serbest demir az iken artırırken, demir fazlalığında azaltırlar (8,26,31).

Yakın zamanlarda hücre içi demir regülasyonunda önemi olan, demirin biyolojik membranlar boyunca transportundan sorumlu bir taşıyıcı bulunmuştur. FPN-1 (ferroportin-1) olarak adlandırılan bu taşıyıcının, ince bağırsak villus hücrelerinde ve polarize epitel hücrelerinin bazolateral membranlarında, demirin bazolateral transferinde yer almak üzere eksprese olduğu gösterilmiştir. FPN-1, ek olarak karaciğerde hem Kupffer hücrelerinde hem de hepatositlerde lokalizedir. İntraselüler ortamlarda serbest demir arttığında çabuk eksprese olmakta ve demirin hücre dışı kompartmanlara taşınmasını sağlamaktadır. Ancak FPN-1’in de belli bir taşıma kapasitesi olduğu ve heminin HO-1 enzimi ile yıkılması sonucu artan serbest demir düzeyinin bu kapasiteyi aşabileceği düşünülmektedir (27).

Hücrenin serbest demir ile baş edebilmek için birçok savunma mekanizması kullanmasına karşın; serbest demir bu mekanizmaları alt edebilir ve hücre yıkımına neden olabilir. Vurgulanması gereken önemli noktalardan birisi de bu koruyucu sistemlerin eksprese olabilmesi için belli bir süre gerektiği ve her dokunun bu koruyucu faktörleri eksprese edebilme yeteneğinin farklı olduğudur ⁽⁸⁾.

2.3.4 HEMİN, HEMOKSİJENAZ ve FERRİTİN ETKİLEŞİMİ

Hemin kaynaklı demirin HO ve ferritin tarafından kontrolünün birçok hücre hasarı modelinde önemli bir savunma mekanizması oluşturduğu bulunmuştur. HO hem demirini salma yetisine sahipken, ferritin oksidatif hasara neden olan demiri bağlayıp depolar. Hemine maruz kalan hücrelerde HO ve ferritinin upregüle olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir ^(4,25,26,27).

Bazı çalışmalar HO-1'in upregülasyonunun serbest demir üretimini arttırarak hücre hasarına neden olabileceğini göstermiştir. Buna karşın diğer bazı çalışmalarda da HO-1'in oksidatif hasara karşı koruyucu rol oynadığı ortaya konulmuştur ⁽²²⁾.

HO-1'in önemi, HO-1 eksikliği olan bir çocuğun keşfiyle aydınlanmıştır. Bu çocukta böbrekte mesengioproliferatif glomerüler değişiklikler ile birlikte aortada yağlı çizgiler ve fibröz plaklar tespit edilmiştir. Benzer şekilde transgenik olarak HO-1 eksikliği oluşturulan farelerde de endotel hasarıyla birlikte hepatik ve renal tubuler sitotoksisite gözlenmiştir ⁽⁴⁾.

Balla ve ark. aortik endotel hücrelerinin hemin uygulanmasından 1 saat sonra H₂O₂ veya aktive nötrofil uyarısı ile öldürülmeye çok daha duyarlı olduğunu; ancak hemin uygulanmasından 14-16 saat sonra oksidatif strese mazruz kaldıklarında, anlamlı şekilde dirençli olduklarını göstermiştir. Hemine meme ve kolon tümörlerinde de benzer yanıtların görülmesi bu etkinin genel uygulanabilirliğini akla getirmektedir. Her durumda direncin

gelişimi hem-oksijenaz (HO-1)'ın ve ferritinin kuvvetle uyarılması ile sağlanmaktadır. Bununla birlikte ferritin, HO-1'den daha direkt olarak rol oynamaktadır. Yeni çalışmalar vasküler endotelin kronik olarak hemin kaynağı olan methemoglobine maruziyetinin, ferritin indüksiyonu ile sonuçlandığını hem in vivo hem in vitro olarak göstermektedir ^(31,26). Endotelde gerçekleşen HO-1 ve ferritinin upregülasyonu, aterosklerotik lezyonların gelişiminin erken fazlarında da görülebilmektedir. Bu da muhtemelen hemin veya demir kaynaklı lipid peroksidasyon ürünlerine karşı hücresel cevabı yansıtmaktadır ⁽²⁵⁾.

Khan ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada HO enzim sisteminin karaciğerde demir birikimi ve oksidatif stres üzerinde aracı rol oynadığı gösterilmiştir. HO sisteminin fizyolojik demir homeostazından sorumlu olduğunu, selektif olarak HO aktivitesinin inhibe olmasının karaciğerde azalmış demir düzeyi ile sonuçlandığını göstermişlerdir. Buna ek olarak direk HO indükleyicisi olan heminin uygulanması ile HO aktivitesinin artması, hem hepatositlerde hem de Kupffer hücrelerinde intraselüler demir artışına yol açmış ve karaciğer dokusunda artmış DNA hasarı ile ilişkili bulunmuştur ⁽²⁷⁾.

Hemin uyarısı ile artan hem-oksijenaz enzim aktivitesinin kümülatif etkisinin faydası aşıkardır. Hemin yıkımı hücreyi demirin zar geçirgen formundan kurtarsa da, sonuçta ortaya çıkan serbest demir, ferritin tarafından toplanmadığında potansiyel bir tehliktir ⁽⁴⁾.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmada erişkin ve ağırlıkları 280-350 gr arasında değişen Wistar Albino ratlar kullanıldı. Dişi ratlar gebelik olasılıkları nedeniyle, normal gebelik süresi olan 21 gün kadar bekletildiler ve gebe olmadığı anlaşılan ratlar çalışmaya dahil edildiler. Gebeliğin oluşması amacıyla 3 dişi rata karşılık 1 erkek rat olacak şekilde ayrı kafeslere konuldular. 24 saat bekletildikten sonra erkek ratlar kafeslerden çıkarıldı. Çiftleştirme sonucunda vajinal tıkaç görülen dişi ratlar gebeliğinin 0. gününde kabul edildi. Çalışmaya gebeliklerinin 19. gününde toplam 8 gebe dişi rat dahil edildi. Ratlar ikişerli 4 gruba ayrıldı. Deneyden 12 saat önce aç ve susuz bırakılarak 30 mg/kg intramusküler (im) ketamin-HCl anestezisi altında steril koşullarda ameliyat edildiler. Periton boşluğuna steril şartlar altında orta hat vertikal bir kesi ile girildi.

Grup 1 (kontrol) (n=6): Ratlara herhangi bir işlem yapılmadan yavrular çıkarıldı. Randomize olarak 6 adet yavrunun karaciğerleri alındı.

Grup 2 (iskemi-reperfüzyon) (n=6) : Laparatomiyi takiben uterin arterler izole edilerek, 30 dakika süreyle klempe edildiler. 1 saatlik reperfüzyon periyodundan sonra randomize olarak 6 adet yavrunun karaciğerleri alındı.

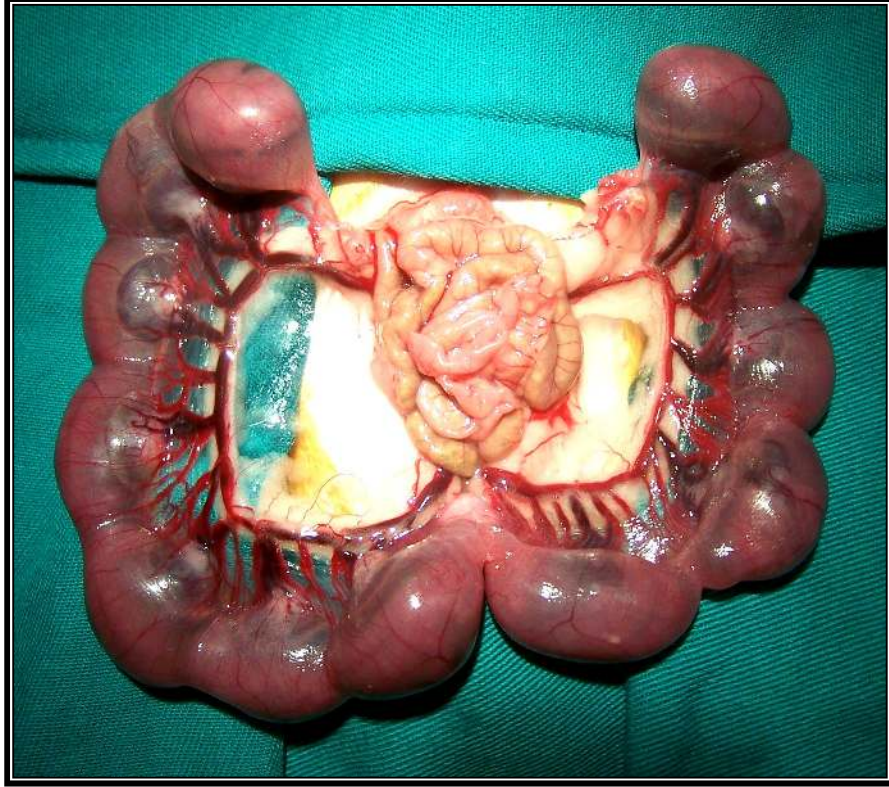
Grup 3 ve grup 4'de kullanılmak üzere hemin (Sigma-Aldrich, Almanya) 50 mg/ml oranında distile su ile sulandırılarak homojenize edildi.

Grup 3 (ilaç) (n=6) : Laparatomiyi takiben intraperitoneal olarak hemin (50 mg/kg) verildi. 1 saat süreyle beklenip, randomize olarak 6 adet yavrunun karaciğerleri alındı.

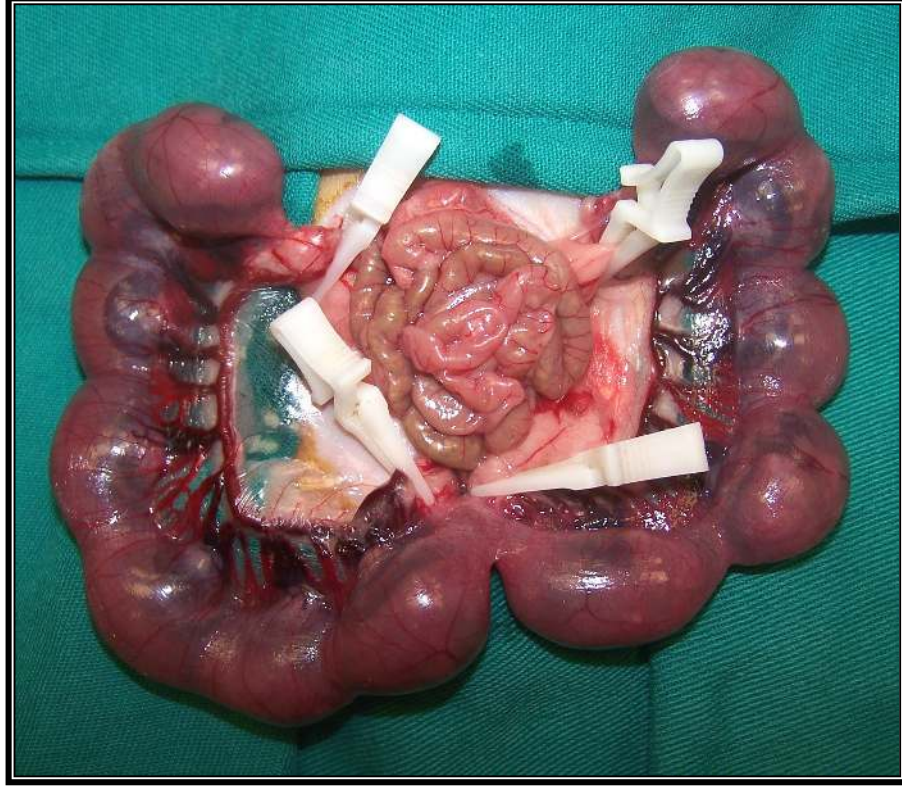
Grup 4 (ilaç+iskemi-reperfüzyon) (n=6) : Laparatomiyi takiben, uterin arterler izole edilerek, 30 dakika süreyle klempe edildiler. Sonrasında intraperitoneal olarak hemin (50

mg/kg) verilip, 1 saatlik reperfüzyon uygulandı. Randomize olarak 6 adet yavrunun karaciğerleri alındı.

Alınan karaciğer dokuları, MDA düzeyi ve MPO aktivitelerinin tayinine kadar -80 C'de saklandı. Gebe ratların karınları kapatılarak yaşamalarına müsaade edildi.



Şekil 6. Rat uterusu ve fötüsler



Şekil 7. Uterin arterlerin klempe edilmesi

3.1 Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak “Thiobarbituric acid reactive substances” (TBARS) değerleri Uchiyama ve Mihara ⁽³⁸⁾ metotları kullanılarak ölçüldü. Doku örnekleri dounce homojenizeri kullanılarak 1:10 (w:v) potasyum fosfat tamponunda (50 mM, pH:7.4) homojenize edildi. 0.5 ml homojenat 3 ml %1 fosforik asit ile karıştırılıp, 1 ml %0.67 TBA eklendi. Tüpler kaynar suda 45 dakika kadar bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra, TBARS n-butanole eklenerek absorbanans 532 nm’de okundu. TBA-MDA kompleksinin molar absorbtivitesi $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alınarak, doku peroksit düzeyleri (TBARS olarak) gram yaş doku başına nanomol olarak hesaplandı.

3.2 Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Ölçümü

Doku myeloperoksidaz aktivitesi Suzuki ve arkadaşlarının⁽⁵⁵⁾ değiştirilmiş yöntemine göre tayin edildi⁽¹¹⁾. Yukarıda belirtildiği gibi, doku örnekleri homojenize edildikten sonra 5 dakika 5000 rpm’de santrifüj edildi ve çöken zarsal kısım MPO aktivitesi tayini için kullanıldı. MPO enzimi de içeren zarsal fraksiyon %0.5 HETAB ve 5 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:6) içinde tekrar homojenize edildi. Örnekler buzdolabında 30 dakika bekletildikten sonra tekrar 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatanda MPO aktivitesi ölçüldü. Aktivite ölçüm ortamı, son hacmi 1 mililitre olacak şekilde, %0.5 HETAB içeren 50 mM fosfat tamponu (pH:5.4), 1.6 mM sentetik substrat tetrametil benzidin (TMB), 2 mM H₂O₂ eklenmesi ile başlatıldı ve 655 nm’de dakikadaki absorpsiyon artışı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu deney koşullarında dakikadaki 1 absorpsiyon değişimi sağlayan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak alındı ve MPO aktivitesi gram yaş doku başına ünite olarak hesaplandı.

3.3 İstatistiksel Analiz

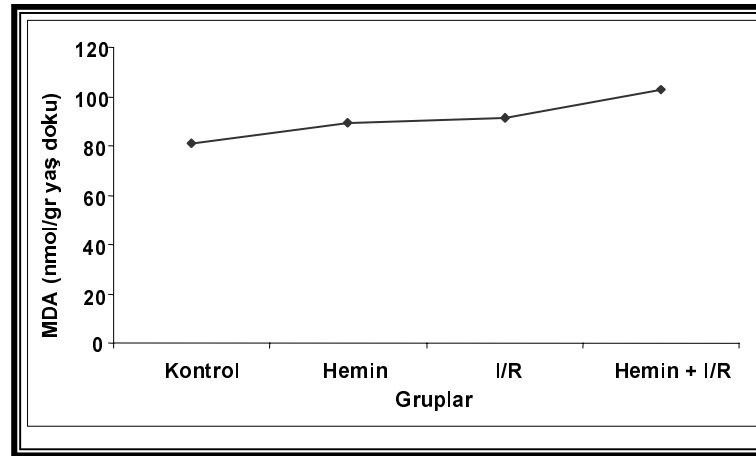
Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterildi. Gruplar arasında MDA ve MPO ölçümleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı sırasıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Kruskal Wallis Varyans Analizi’yle değerlendirildi. Anlamlı farkın görüldüğü yerlerde MDA için Tukey çoklu karşılaştırma, MPO için Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testleri yapılarak farka neden olan grup veya gruplar tespit edildi. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tablo I. Gruplar Arasında MDA Düzeylerinin Dağılımını Gösteren Tablo

GRUPLAR	n	Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	6	81,2	1,91
Hemin	6	89,3	2,03
I/R	6	91,2	2,07
Hemin + I/R	6	102,7	4,30

Gruplar arasında MDA ölçümleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,001$). Buna göre kontrol grubunun MDA ölçümleri diğer üç gruba nazaran daha düşük olup p değerleri 0,001'den küçük bulunmuştur. Hemin grubunun MDA düzeyi ise Hemin + I/R grubuna göre daha düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Aynı grubun I/R grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,638$). I/R grubunun MDA düzeylerinin Hemin + I/R göre düşük bulunması da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Özetle MDA yönünden kontrol grubunun ölçümleri diğer gruplara göre daha düşük, Hemin + I/R grubunun ölçümleri ise diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur.

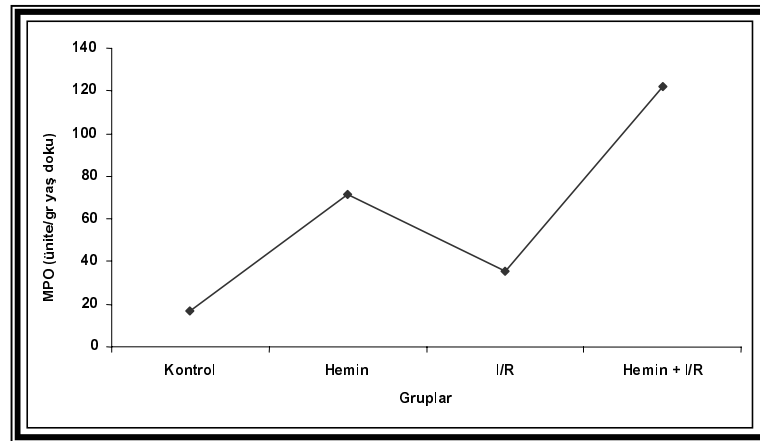


Şekil 8. Gruplar Arasında MDA Düzeylerini Gösteren Grafik

Tablo II. Gruplar Arasında MPO Düzeylerinin Dağılımını Gösteren Tablo

GRUPLAR	n	Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	6	16,7	0,93
Hemin	6	71,6	6,26
I/R	6	35,5	1,19
Hemin + I/R	6	121,8	14,96

Gruplar arasında MPO ölçümleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,001$). Buna göre kontrol grubunun MPO ölçümleri diğer üç gruba nazaran daha düşük olup, p değerleri 0,001'den küçük bulunmuştur. Hemin grubunun MDA düzeyi ise Hemin + I/R grubuna göre daha düşük bulunurken ($p<0,001$), I/R grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$). I/R grubunun MPO düzeylerinin Hemin + I/R göre düşük bulunması da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Özetle MPO ölçümleri yönünden tüm grupların birbirleriyle aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar söz konusudur ve şu şekilde bir ifade yazılabilir. MPO ölçümleri yönünden; **Kontrol < I/R < Hemin < Hemin + I/R**

**Şekil 9.** Gruplar Arasında MPO Düzeylerini Gösteren Grafik

5. TARTIŞMA

Gebelik sırasında uterin kan akımını azaltan durumlar immatür fetal dokuların iskemik hasarına neden olurlar. Prenatal dönemde iskemiye maruz kalan yenidoğanların bir kısmı çeşitli nedenlerle çocuk cerrahisi kliniklerinde takip edilmektedir. Bu hastaların takipleri sırasında cerrahi stresin de eklenmesiyle renal yetmezlik ve karaciğer disfonksiyonuna daha yatkın olduklarını biliyoruz. Fötal iskemiye maruz kalan yenidoğanlar için gerek prenatal gerekse postnatal dönemde, doku hasarının önlenmesine yönelik çeşitli ajanlar araştırılmaktadır.

Bu çalışmada fötal iskemi-reperfüzyon modeli kullanarak gelişmekte olan fötal karaciğer dokusundaki hasar mekanizmasını araştırmayı amaçladık. Fötal karaciğer dokusunu, yoğun metabolik aktivitesi ve organizmanın homeostazındaki önemli nedeniyle seçtik. İskemi-reperfüzyon hasarında araştırma konusu olan bir çok ajan mevcut olup, bunlardan biri de hemindir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda heminin iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidan ve prooksidan etki gösterdiğine dair birçok karşıt yayın bildirilmiştir. Ancak heminin fötal dokularda oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarına etkisine ilişkin bir çalışma şimdiye kadar yapılmamıştır. Bu nedenle heminin fötal dokulardaki etkisini araştırmayı uygun gördük.

Heminin hem antioksidan hem de prooksidan aktivitelerinin olduğu bir çok in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir. Bu birbiri ile tamamen zıt sonuçlar, heminin HO ile yıkımının hücre için bir yandan yararlı olduğu, öte yandan da potansiyel riskler oluşturduğu gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Heminin antioksidan özelliği olduğunu savunan hipoteze göre; lipofilik hemin biliverdine daha sonra da bilirübine indirilir ki; her iki pigment de antioksidandır. Ayrıca hemin yıkımı ile açığa çıkan karbon monoksitin antienflamatuar ve vazodilatatör etki göstererek doku hasarını azalttığı da savunulmaktadır ^(12,40,41,54). Karşıt

görüşü savunan çalışmalar ise, heminin yıkımıyla açığa çıkan serbest demirin prooksidan aktivitesinden dolayı zararlı etkileri olduğunu göstermektedir ^(3,4,7,15,20,22,25,27,43).

Çalışmamızda doku hasarını tespit etmek için lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve nötrofillerin aktivasyonunu gösteren MPO aktivitelerini ölçtük ^(2,10). Sonuçta heminin hem tek başına hem de iskemi-reperfüzyonla birlikte kullanıldığında MDA ve MPO düzeylerini arttırdığını bulduk. Bu sonuçların ışığı altında heminin fütal iskemi-reperfüzyon modelinde prooksidan özelliği olduğu kanaatine vardık.

Heminin fütal karaciğer dokusu üzerinde prooksidan etki göstermesinin nedenleri; HO-1 enzimi ve ferritin ekspresyonu için yeterli süre beklenilmemiş olması, HO-1'in aşırı uyarılması ile fazla miktarda serbest demir açığa çıkması, fütal karaciğer dokusunda HO-1 enzim matürasyonunun yeterli olmayıp direkt hemin toksisitesine maruz kalması, verilen hemin dozunun fazla olup, HO sisteminin yüksek dozla başa çıkamaması olarak düşünülebilir.

Heminin antioksidan olduğunu savunan görüşe göre, hemin HO sistemi tarafından yıkılmakta, açığa çıkan yıkım ürünlerinden bilirubin ve CO antioksidan etki gösterirken, serbest demir hücre içi ferritin depolarına taşınarak oksidan etkisi ortadan kalkmaktadır ^(12,40,54). Ancak bu etki dokuların HO ve ferritin kapasitelerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Heminin hücrelerde HO-1 ve ferritin transkripsiyonunu ve translasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ancak transkripsiyon ve translasyon sonucu hücre içerisinde HO-1 ve ferritin düzeylerinin artması belli bir süreyi gerektirmektedir. Balla ve ark. hemin uygulanan endotel hücrelerinin, hemin uygulandıktan 1 saat sonra H₂O₂ veya aktive nötrofil uyarısı ile öldürülmeye çok daha duyarlı olduğunu; ancak hemin uygulanmasından 14-16 saat sonra oksidatif strese karşı anlamlı şekilde dirençli olduklarını göstermiştir. Direnç mekanizmasının HO-1 ve ferritin hücre içi miktarları arttıktan sonra geliştiğini öne sürmüşlerdir ^(4,25,26,31).

Bizim çalışmamızda, doku örnekleri hemin uygulanmasından 1 saat sonra ve iskemi-reperfüzyon modelinde de 1 saatlik reperfüzyon sonrası alınmıştır. HO-1 ve ferritin ekspresyonuna izin verilecek kadar beklenmiş olsaydı, belki de daha farklı sonuçlar alınabilirdi. Bunu da çalışmamızın ikinci bölümü olarak planladık.

Fötal karaciğer dokusunda HO-1 enzim matürasyonunun yetersiz olabileceği görüşümüz de heminin direkt toksik etki göstererek yıkım yapmış olabileceği fikrini desteklemekle birlikte, doku HO-1 enzim düzeyinin ölçüldüğü ileri araştırmalar gerektirmektedir.

Karaciğer, demiri pasif olarak absorbe edebilmesi özelliğiyle benzersizdir. Bu da demir toksisitesinde hedef organ oluşunun nedenlerinden birisidir ⁽⁵⁸⁾. HO-1 enzim sistemi, aşırı uyarıldığında açığa çıkan serbest demir toksisitesinden sorumlu olabilmektedir. Hepatositlerde LIP (labile iron pool=değişken demir havuzu)'daki serbest demirin prooksidan kimyasallar ile ve posthipoksik reoksijenasyon ile provoke olan hücre hasarında, reaktif oksijen türevlerinin katalizlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Böylece LIP'daki serbest demir konsantrasyonundaki değişiklikler hepatoselüler hasarın genişliğini etkilemektedir ⁽⁵³⁾. Ek olarak süperoksit radikalının oksidatif stres altında ferritinden serbest demir salınmasına neden olduğu gösterilmiştir ⁽¹³⁾. Fötal karaciğer dokusunda hemin yıkımıyla açığa çıkan serbest demir doku hasarından sorumlu tutulabilir.

Hücre içi serbest demirin toplanmasında ferritinin büyük önemi vardır. Fakat ferritinin demir toplama kapasitesinin ve ekspresyonunun dokudan dokuya farklılık gösterdiği bilinmektedir ^(4,25,26,27). Hücre içi demir regülasyonunda iki önemli sitozolik protein olan IRP-1 ve IRP-2 ile hücrelerden demir ihracına neden olan FPN-1 (ferroportin-1) halen araştırılmakta olan yapılardır. İleriki çalışmalarımızda, hücre içi serbest demir regülasyonuna katkıda bulunan bu yapıların fötal dokular üzerindeki etkisini araştırmayı planlamaktayız.

Hemin ile ilgili olarak daha önceden f tal dokuları içeren bir çalışma yapılmadığı için verdiğimiz doz miktarı hakkında yorum yapamamaktayız. Ancak daha önce yapılan çalışmalarda ratlarda hemin dozunun 50 mg/kg olarak intraperitoneal veya subkutanöz olarak verilebileceği bildirilmektedir ^(17,41). Biz de önceki çalışmaları referans alarak anne ratlara 50 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla hemin uyguladık. İleriki çalışmalarda farklı dozlar uygulanarak, doku hasarındaki değişiklikler değerlendirilebilir.

Bu çalışmada ortaya çıkan sonuçlar bir çok yönden tartışma konusu olsa da, heminin hem tek başına, hem de iskemi-reperfüzyon hasarı ile birlikte f tal karaciğer dokusunda kısa sürede ciddi doku hasarı yaptığı görülmektedir. Ancak bu konuda daha detaylı araştırmaların yapılması gerekliliği aşıkardır. Dokuda HO-1 ve ferritin gen ekspresyonu, HO-1 ve ferritin düzeylerinin tayini, serbest demir düzeyinin gösterilmesi, oluşan hasarın histopatolojik olarak gösterilmesi gibi ileri dönem çalışmaları planlanmaktadır.

Hemin kullanarak yaptığımız bu çalışma farklı bir konuya da ışık tutmaktadır. Septisemi ve DIC tablosunda olan hastalarda sürekli olarak eritrosit yıkımı, serbest hemoglobin ve sonucunda da serbest hemin açığa çıkmaktadır. Ayrıca bu hastaların sık kan transfüzyonu almaları da hemin ve serbest demir toksisitesi açısında ek yük getirmektedir. Bu hastalarda DFO (desferroksamin) gibi şelatörlerin kullanılması da ileri araştırma konusu olabilir.

6. SONUÇLAR

Fötal iskemi-reperfüzyon modelinde fötal karaciğer dokusunda MDA ölçümleri değerlendirilip; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R, hemin ve hemin+İ/R grubunda artmış MDA düzeyleri gözlenerek istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). İ/R grubunda MDA düzeyi Hemin grubundan yüksek bulunsa da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,638$). Hemin+İ/R grubu, İ/R ve hemin gruplarıyla ayrı ayrı kıyaslandığında da MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı farkla yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Bu bulgulara göre, iskemi-reperfüzyon fötal karaciğer dokusunda hasara yol açmaktadır. Hemin bağımsız olarak doku hasarı oluşturmaktadır. İskemi-reperfüzyon ile birlikte hemin uygulanması, doku hasarında en yüksek düzeyde artışa yol açmaktadır.

MPO ölçümleri değerlendirildiğinde ; İ/R, Hemin ve Hemin+İ/R grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek değerler sergiledi ($p<0.001$). Tüm gruplar MPO ölçümleri açısından kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdi ve bu durum Kontrol<İ/R<Hemin<Hemin+İ/R şeklinde ifade edildi.

MPO ölçümleri açısından iskemi-reperfüzyon fötal karaciğer dokusunda hasara yol açmaktadır. Hemin bağımsız olarak iskemi-reperfüzyondan daha fazla doku hasarına neden olmaktadır ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). İskemi-reperfüzyon ile birlikte hemin uygulanması en fazla doku hasarına neden olmaktadır.

7. ÖZET

Uterin ve umbilikal arterde kan akımının akut olarak azalması fetusta hipoksi ve iskemik organ lezyonlarına, dolayısıyla da yenidoğanda ciddi morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu nedenle doku hasarının antioksidanlar ile önlenmesi fetal hayatta büyük önem arz etmektedir.

Fetal iskemi-reperfüzyon hasarına heminin karaciğerdeki etkisini arştırmak üzere bir fetal-iskemi reperfüzyon modeli oluşturduk. Bu amaçla 8 adet 19 günlük gebeliği olan Wistar-albino ratı ikişerli gruplara ayırarak; Kontrol, I/R, Hemin ve Hemin+I/R grupları oluşturduktan sonra fetal karaciğer dokusunda MDA ve MPO ölçümleri yaparak doku hasarını inceledik.

Heminin antioksidan ve prooksidan özellikleri olduğunu savunan karşıt görüşler bulunmaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerin sonuçlarına göre hemin tek başına doku hasarına neden olmuştur. Ayrıca heminin, iskemi-reperfüzyon ile birlikte kullanıldığında, oluşan doku hasarını daha fazla arttırdığını da gözlemledik. Fetal iskemi-reperfüzyon hasarında heminin kısa dönem sonuçları göz önüne alındığında, kullanılmasının uygun olmadığı görüşündeyiz. Bunula birlikte uzun dönem etkilerinin daha ileri araştırmalara konu edilip, değerlendirilmesinin gerektiğini düşünmekteyiz.

8. SUMMARY

Acute cessation of blood flow of uterine and umbilical arteries causes severe fetal mortality and morbidity by causing fetal hypoxemia and ischemic injuries in fetal tissues. Therefore, preventing tissue injuries originating from fetal ischemia reperfusion injury by antioxidant agents is crucial.

We utilized a fetal ischemia reperfusion model in order to study the effect of hemin on fetal liver. Eight wistar albino female rats in the nineteenth day of their pregnancy were used in the experiment. The rats were randomly allocated in four groups as: Control, Hemin, I/R and Hemin+I/R. Tissue MDA and MPO levels were measured in the fetal liver tissues in order to evaluate tissue injury.

There are many publications to investigate hemin's antioxidant and prooxidant effects in the literature. We found that hemin caused tissue injury by itself. In addition, hemin administered in order to prevent liver injury in fetal tissues during fetal ischemia reperfusion even more deteriorated the tissues. These results revealed that hemin was not a suitable scavenger for fetal liver ischemia reperfusion injury when its favorable effects were expected in short time. However, we believe that evaluation of its long time effects should be considered.

9. KAYNAKLAR

1. Agar NS, Sadrzadeh SM, Eaton JW. Erythrocyte catalase: A somatic oxidant defence?: J Clin Invest 77(1):319-321, 1986
2. Allan G, Bhattacharjee P, Brook CD, Read NG, Parke AJ: Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct-the effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation: J Cardiovasc Pharmacol 7(6):1154-1160, 1985
3. Balla G, Vercellotti GM, Mulder-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species: Lab Invest 64(5):648-655, 1991
4. Balla J, Vercellotti GM, Nath K, Yachie A, Nagy E, Eaton JW, Balla G. Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury: Nephrol Dial Transplant 18 suppl 5:v8-12, 2003
5. Basaga HS : Biochemical aspects of free radicals: Biochem. Cell Biol 68(7-8):989-998, 1990
6. Bulkey GB. Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function: Lancet 344(8927):934-936, 1994
7. Chen-Roetling J, Benvenisti-Zarom L, Regan RF. Cultured astrocytes from heme oxygenase-1 knockout mice are more vulnerable to heme-mediated oxidative injury: J Neurosci Res 82(6):802-810, 2005
8. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ: Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. J Inorg Biochem 91(1):9-18, 2002
9. Cybulsky MI, Colditz IG, Movat HZ: The role of interleukin 1 in neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Am J Pathol 124(3):367-372, 1986
10. Czyrko C, Steigman C, Turley DL, Drott HR, Ziegler MM: The role of reperfusion injury in occlusive intestinal ischemia of the neonate: malonaldehyde-derived fluorescent products and correlation of histology. J Surg Res 51(1):1-4, 1991.
11. Demirpençe E, Köksoy C, Kuzu A, Kılınç K: A spectrophotometric assay for tissue-associated myeloperoxidase activity and its application to intestinal ischemia-reperfusion. Turk J Med Sci 27:197-200, 1997
12. Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, Piegari E, Petronella P, Giugliano D, Rossi F, D'Amico M: Hyperglycemia in streptozocin-induced diabetic rat increased infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion. Diabetes 54(3):803-810, 2005

13. Emerit J, Beaumont C, Trivin F: Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 55:333-339, 2001
14. Ergenel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A: Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi* 3:243-250, 1992
15. Everse J, Hsia N: Toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med* 22(6):1075-1099, 1997
16. Fantel AG, Marckler B, Stamps LD, Tran TT and Person RE: Reactive oxygen species and DNA oxidation in fetal rat tissues. *Free Radic Biol Med* 25(1):95-103, 1998
17. Farhangkhoei H, Khan ZA, Mukherjee S, Cukiernik M, Barbin YP, Karmazyn M, Chakrabarti S: Heme oxygenase in diabetes-induced oxidative stress in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 35(12):1439-1448, 2003
18. Flitter WD: Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br Med Bull* 49(3):545-555, 1993
19. Gleit M, Klenow S, Sauer J, Wegewitz U, Richter K, Pool-Zobel BL: Hemoglobin and heme induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res* 594:162-171, 2006
20. Goldstein L, Teng ZP, Zeserson E, Patel M, Regan RF: Heme induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *J Neurosci Res* 73(1):113-121, 2003
21. Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 344:721-724, 1994
22. Huang FP, Xi G, Keep RF, Hua Y, Nemoianu A, Hoff JT: Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *J Neurosurg* 96(2):287-293, 2002
23. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. Glucose autooxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256(1):205-212, 1988.
24. Ishimoto H, Natori M, Tanaka M, Miyazaki T, Kobayashi T, Yoshimura Y: Role of oxygen-derived free radicals in free growth retardation induced by ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol* 272(2 Pt 2):H701-705, 1997
25. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G: Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100(3):879-887, 2002

26. Juckett M, Zheng Y, Yuan H, Pastor T, Antholine W, Weber M, Vercellotti G: Heme and the endothelium. Effects of nitric oxide on catalytic iron and heme egradation by heme oxygenase. *J Biol Chem* 273(36):23388-23397, 1998
27. Khan ZA, Barbin YP, Cukiernik M, Adams PC, Chakrabarti S: Heme-oxygenase-mediated iron accumulation in the liver. *Can J Physiol Pharmacol* 82(7):448-456, 2004
28. Kılınç K: Oksijen radikalleri: Üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi* 10:60-89, 1985
29. Kılınç K: Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. *Biyokimya Dergisi* 3:59-76, 1986
30. Kusterer K, Blochle C, Konrad T, Palitzsch KD, Usadel KH: Rat liver injury induced by hypoxic ischemia and reperfusion: protective action by somatostatin and two derivatives. *Regul Pept* 44(3):251-256, 1993.
31. Lin F, Girotti AW: Elevated ferritin production, iron containment, and oxidant resistance in hemin-treated leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 346(1):131-141, 1997
32. Luscinkas FW, Brock AF, Arnaout MA, Gimbrone MA Jr: Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1-dependent and leukocyte (CD11/CD18) dependent mechanisms contribute to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cytokine activated human vascular endothelium. *J Immunol* 142(7):2257-2263, 1989
33. Luscinkas FW, Cybulsky MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gibmbrone MA Jr: Cytokine activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 146(5):1617-1625, 1991
34. Mayes PA: *Biyolojik Oksidasyon: Harper Biyokimya*. 25. Baskı. Dikmen N, Özgünen T (Çev. Ed), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004, S:135-136.
35. Mayes PA: *Yağda Çözünür Vitaminlerin Yapısı ve İşlevi: Harper Biyokimya*. 25. Baskı. Dikmen N, Özgünen T (Çev. Ed), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004, S:645-648.
36. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312(3):159-163, 1985
37. Meister A: Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220:472-477, 1983
38. Mihara M, Uchiyama M: Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271-278, 1977

39. Mitchell RN, Cotran RS: Hücre Zedelenmesi Adaptasyonu ve Ölümü:Robins Temel Patoloji. Çevikbaş U (Çev. Ed), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2003, S:8-10.
40. Nakao, Neto Js, Kano S, Stolz DB, Kimizuka K, liu F, Bach FH, Billiar TR, Choi AM, otterbein LE, Murase N: Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 5(2):282-291, 2005
41. Ohta K, Kikuchi T, Arai S, Yoshida N, Sato A, Yoshimura N: Protective role of heme oxygenase-1 against endotoxin-induced uveitis in rats. *Exp Eye Res* 77(6):665-673, 2003
42. Persson HL, Yu Z, Tirosh O, Eaton JW, Brunk UT: Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic Biol Med* 34(10):1295-1305, 2003
43. Phumala N, Porasuphatana S, Unchern S, Pootrakul P, Fucharoen S, Chantharaksri U: Hemin: a possible cause of oxidative stres in blood circulation of β -thalassemia/hemoglobin E disease. *Free Radic Res* 37(2):129-135, 2003
44. Pierrefiche G, Laborit H: Oxygen free radicals, melatonin and aging. *Exp Gerontol* 30:213-227, 1995
45. Pietrangelo A: Mechanism of iron toxicity. *Adv Exp Med Biol* 509:19-43, 2002
46. Raud J, Lindbom L: Leukocyte rolling and film adhesion in the microcirculation. *Gastroenterology*. 104(1):310-314, 1993
47. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radikals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 161(4):488-503, 1991
48. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D: Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 854:410-424, 1998
49. Schoenberg MH, Berger HG: Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 21(9):1376-1386, 1993
50. Seekamp A, Ward PA: Ischemia-reperfusion injury. *Agents Actions Suppl* 41:137-152, 1993.
51. Slater TF: Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222(1):1-15, 1984
52. Solaroğlu A, Dede FS, Okutan E, Bayrak A, Haberal A, Kilinc K: A single dose of erythropoietin attenuates lipid peroxidation in experimental liver ischemia-reperfusion injury in the rat fetus. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 16(4):231-234, 2004

53. Stäubli A, Boelsterli UA: The labile iron pool in hepatocytes: prooxidant-induced increase in free iron precedes oxidative cell injury. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1):G1031-1037, 1998
54. Supinski GS, Callahan LA: Hemin prevents cardiac and diaphragm mitochondrial dysfunction in sepsis. *Free Radic Biol Med* 40(1):127-137, 2006
55. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leucocytes. *Anal Biochem.* 132(2):345-352, 1983.
56. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cevaljo D: Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 55(6):1265-1272, 1993
57. Tan S, Yokoyama Y, Wang Z, Zhou F, Nielsen V, Murdoch AD, Adams C, Parks DA: Hypoxia-reoxygenation is as damaging as ischemia-reperfusion in the rat liver. *Crit Care Med* 26(6):1089-1095, 1998
58. Tenenbein M: Toxicokinetics and toxicodynamics of iron poisoning. *Toxicol Lett* 102-103:653-656, 1998
59. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB: Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 78(6):651-655, 1991