

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

HEPSİDİNİN KALP İSKEMİ REPERFÜZYONUNA ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

ATILLA BAYRAKTAR

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Deniz ERBAŞ

ANKARA
Mart 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

HEPSİDİNİN KALP İSKEMİ REPERFÜZYONUNA ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

ATILLA BAYRAKTAR

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Deniz ERBAŞ

Bu tez Gazi Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2010-56 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
26/03/2013

ÖNSÖZ

TEŞEKKÜR

Tezimi hazırlamam sırasında her aşamada zamanını, bilgisini, deneyimini ve hoşgörüsünü benimle paylasan, Fizyoloji Bilimi'nden keyif almamı sağlayan Sayın Danışman Hocam, Prof. Dr. Deniz ERBAŞ'a, eğitimimde emeği geçen Sayın Hocalarım; Prof. Dr. Aydan BABÜL, Prof. Dr. Lamia PINAR, Prof. Dr. Sibel DİNÇER, Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT ve Prof. Dr. Çiğdem ÖZER'e, desteklerinden dolayı Sayın Hocam Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU, Prof. Dr. Semra ERBAŞ ve Prof. Dr. Yusuf KADIOĞLU'na, tez izleme jürisinde yer alan ve katkı sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Eser ÖZ ve Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU'na, doktora eğitimim boyunca birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve bana her zaman destek olan çok değerli; ebeveynlerim, kardeşime teşekkür ederim.

KABUL VE ONAY

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fizyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/03/2013



Prof. Dr. Deniz ERBAŞ

Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Aydan BABÜL

Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. Ethem GELİR

Hacettepe Üniversitesi



Prof. Dr. Sema ÖMEROĞLU

Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Ayşe ARICIOĞLU

Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Tablolar, Şekiller, Resimler	VI
Semboller, Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Hepsidinin Keşfi	3
2.2.Hepsidinin Fizikokimyasal Yapısı	4
2.3.Hepsidin Sentezi	6
2.4.Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi	7
2.4.1.Demir ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi	7
2.4.2.Hipoksi ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi	8
2.4.3.Anemi ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi	9
2.4.4.İnflamasyon ve Enfeksiyon ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi	10
2.4.5.Eritropoetik Aktivite ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi	11
2.5.Hepsidinin Etki Mekanizması ve Kinetiği	12
2.6.Miyokardial İskemi-Reperfüzyon Hasarı	14
2.7.Kalp İskemi-Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları	15
2.8.Nitrik oksit (NO)	18
2.9.Kalp Fizyolojisi	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1.Deney Hayvanları	21
3.2.Kullanılan Cihazlar	21
3.3.Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
3.4. Cerrahi İşlem	23
3.5. Çalışma Grupları	23
3.6. Çalışma Protokolü	23
3.7.İzole Perfüze Kalp	24

3.8.Perfüzat ve Doku Çalışması	25
3.9.Doku ve Perfüzat NOx (Nitrit ve Nitrat) Tayini	25
3.10.Doku Malondialdehit (MDA) Tayini	26
3.11.Doku Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	26
3.12.Histolojik Değerlendirme	27
3.13.İmmunohistokimyasal Yöntem	27
3.14. Perfüzat Viskozite Tayini	27
3.15.İyon Tayinleri	28
3.16.İstatistiksel Değerlendirme	28
4.BULGULAR	29
4.1.Doku NOx (Nitrit ve Nitrat) Düzeyleri	29
4.2.Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	30
4.3.Doku Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyleri	31
4.4.Perfüzat NOx Düzeyleri	32
4.5.Perfüzat Viskozite Ölçümü	32
4.6.Perfüzat Element Değerleri	33
4.7.Histolojik Bulgular	36
4.8.İmmunohistokimyasal Bulgular	42
5.TARTISMA	48
6.SONUÇ	54
7.ÖZET	55
8.SUMMARY	56
9.KAYNAKLAR	57

TABLolar, ŞEKİLLER ve RESİMLER

Tablolar

Tablo 1	Kalp dokusu NOx (Nitrit ve Nitat) değerleri	29
Tablo 2	Kalp dokusu Malondialdehit (MDA) değerleri	30
Tablo 3	Kalp dokusu Redükte Glutasyon (GSH) değerleri	31
Tablo 4	Kalp perfüzatı NOx (Nitrit ve Nitat) değerleri	32
Tablo 5	Kalp perfüzatı viskozite değerleri	32
Tablo 6	Kalp perfüzatı Demir düzeyleri	33
Tablo 7	Kalp perfüzatı Kalsiyum düzeyleri	33
Tablo 8	Kalp perfüzatı Magnezyum düzeyleri	34
Tablo 9	Kalp perfüzatı Potasyum düzeyleri	34
Tablo 10	Kalp perfüzatı Sodyum düzeyleri	34
Tablo 11	Kalp perfüzatı Talyum düzeyleri	35

Şekiller

Şekil 1	İnsan hepsidin molekülünün ana formu	5
Şekil 2	Oksidan ve Antioksidan sistemler	17
Şekil 3	Deney Protokolü	24
Şekil 4	Kalp dokusu NOx (Nitrit ve Nitat) değerleri	29
Şekil 5	Kalp dokusu Malondialdehit (MDA) değerleri	30
Şekil 6	Kalp dokusu Redükte Glutasyon (GSH) değerleri	31

Resimler

Resim 1	Kalp kası kontrol grubu histolojik bulgular-1	37
Resim 2	Kalp kası kontrol grubu histolojik bulgular-2	38
Resim 3	Kalp kası kontrol grubu histolojik bulgular-3	39
Resim 4	Kalp kası hepsidin grubu histolojik bulgular-1	40
Resim 5	Kalp kası hepsidin grubu histolojik bulgular-2	41
Resim 6	Kalp kası kontrol grubu immunohistokimyasal bulgular-1	43
Resim 7	Kalp kası kontrol grubu immunohistokimyasal bulgular-2	44
Resim 8	Kalp kası kontrol grubu immunohistokimyasal bulgular-3	45
Resim 9	Kalp kası hepsidin grubu immunohistokimyasal bulgular-1	46
Resim 10	Kalp kası hepsidin grubu immunohistokimyasal bulgular-2	47

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

AME	akut miyokard enfarktüsü
ATP	adenozin trifosfat
bd	bağ dokusu
BHT	butylated hydroxytoluene
Ca ²⁺	kalsiyum
CaCl ₂	kalsiyum klorür
CO ₂	karbondioksit
ç	çekirdek
DNA	deoksiribonükleik asit
DTNB	5',5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid
EAM	deneysel otoimmün miyokardit
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Fe SO ₄	demir sülfat
Fe	demir
GDF15	growth differentiation factor 15
GPx	glutatyon peroksidaz
GRd	glutatyon redüktaz
GSH	redükte (indirgenmiş) glutatyon
GSSG	okside glutatyon
H.E.	Hematoksilen – Eozin
H ₂ O	su
H ₂ O ₂	hidrojen peroksid
HCl	hidroklorik asit

HFE	human hemochromatosis protein
HH	herediter hemokromatoz
HIF	hypoxia induced factor - (hipoksi ile uyarılabilir faktör)
HJV	hemojuvelin
ICP-OES	indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi
I/R	iskemi reperfüzyon
İL-6	interlökin-6
iNOS	indüklenebilir nitrik oksit sentaz
KAT	katalaz
KCl	potasyum klorür
KH	Krebs- Henseleit solüsyonu
KH ₂ PO ₄	potasyum dihidrojen fosfat
kl	kas lifi
LEAP-1	liver-expressed antimicrobial peptide
LOOH	lipid hidroperoksitleri
LPS	lipopolisakkarid
MDA	malondialdehit
MgSO ₄	magnezyum sülfat
mRNA	mesajcı ribonükleik asit
Na ⁺	sodyum
Na ₂ HPO ₄	disodyum hidrojen fosfat
NaCl	sodyum klorür
NADPH	nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaHCO ₃	sodyum bikarbonat
NaOH	sodyum hidroksit

NO	nitrik oksit
NO ⁻²	nitrit
NO ⁻³	nitrat
NO _x	nitrojen oksit türleri (nitrit ve nitrat)
O ₂	oksijen
O ₂ ⁻	süperoksit anyonu
OH•	hidroksil radikali
ONOO ⁻	peroksinitrit
PG	prostaglandin
ppm	parts per million
RCF	rölatif santrifüj kuvveti
ROS	reactive oxygen species
RPM	rotation per minute
SOD	süperoksit dismutaz
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 geni
TBA	2-thiobarbituric acid
TBA	tiyobarbitürik asit
TCA	trichloroacetic acid
TWSG1	twisted gastrulation protein 1
USF2	upstream stimulatory factor 2
VaCl ₂	vanadyum klorür
VHL/HIF	Von Hippel–Lindau/hypoxia-inducible transcription factor
ZnSO ₄	çinko sülfat

1.Giriş

Peptid yapısında küçük bir hormon olan hepsidinin, demir metabolizmasının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığı, vücut savunmasında ve inflamasyonda aracı olarak görev aldığıın 2000 yılında keşfi ile birlikte hereditör hemokromatozisin (HH) çeşitli tiplerinin patogenezinine ışık tutulmuş ve inflamasyon anemisinin patofizyolojisine bakış değişmiştir.^{1,2}

Plazma demir düzeylerinin ve dokulardaki demir depolarının artışı ile sentezi uyarılan hepsidin, makrofajlardan ve duodenal enterositlerden plazmaya demir salınımını azaltmaktadır, bu homeostatik döngü, plazma demirinin sabit bir aralıkta tutulmasını sağlarken, aşırı demir emilimini ve dokularda demir birikimini önlemektedir.³

Demir depoları yeterli veya yüksek olduğunda, karaciğer hepsidin üretimini artırır. Hepsidin, ince bağırsakta ferroportini internalize ederek demiri enterositlerden plazmaya taşıyan tek yolu bloke eder.^{1,4}

Günümüzde hepsidin, demir metabolizmasının düzenlenmesindeki temel hormon olarak kabul edilmektedir.⁵

Myokardiyal iskemi, iskeminin derecesi ile ilişkili olarak, artmış ferritin ile sonuçlanmaktadır.^{6,7}

Kalp miyositleri içinde de demir depolanması ilgi çekmektedir, kalp hücrelerinde aşırı demir birikimi oksidatif strese neden olur ve Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksit tarafından DNA hasarı oluşması nedeniyle miyokard fonksiyonunu değiştirir.⁸

Hepsidin kalpten de salınabilen intrinsek kardiyak bir hormondur, salınımı hipoksi ve inflamasyon ile düzenlenir.^{6,9}

Kalpte hipoksi ile yükselen hepsidin düzeyleri; artmış intrasellüler ferritin konsantrasyonu serbest sitozolik demir (Fe^{+2}) konsantrasyonunu kontrol ederek serbest radikallere karşı kardiyak hücreleri koruyucu bir mekanizma oluşturabilir.¹⁰

Çalışmamızda bilgiler ışığında, kalp iskemi – reperfüzyonu uygulanmış sıçanlarda, kalp fonksiyonuna hepsidinin etkisini görmeyi amaçladık. Bu amaçla dokuda oksidatif stres göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyi, antioksidan sistemin etkisini gösteren redükte glutatyon (GSH) ve dokularda hem oksidan hem de antioksidan etki gösterebilen nitrojen oksit türleri (nitrit ve nitrat) (NO_x) düzeyini, perfüze NO_x düzeyini, immünohistokimyasal yöntemle apoptozis ve histolojik olarak kalp dokusu yapısını inceledik. Kalpten çıkan sıvıda (perfüze) perfüzyon öncesi ve sonrası vizkozite tayinleri ve iyon miktarı analizini yaptık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Hepsidinin Keşfi

Antimikrobiyal özellikteki bu peptidi 2000'de Krause ve ark. plazma ultrafiltratından izole etmiş ve karaciğerden sentez edildiği bulununca LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) olarak adlandırmışlardır.¹¹

2001 yılında Park ve ark. çeşitli insan vücut sıvılarının katyonik antimikrobiyal özelliklerini incelerken, idrarda karaciğer kaynaklı ve in vitro antibakteriyel özelliklere sahip yeni bir peptid bulmuş ve onu hepsidin (**hepatik bactericidal protein**) olarak adlandırmışlardır.¹²

Demir metabolizmasıyla hepsidinin bağlantısını Nicolas ve arkadaşları ile Pigeon ve arkadaşları, omurgalılarda göstermişlerdir. Nicolas ve arkadaşları tamamen şans eseri farelerde hepsidin geninin demir metabolizmasında rol oynadığını bulmuşlardır. Glikoz metabolizmasına bağlı transkripsiyon faktör USF2 (upstream stimulatory factor 2) geni eksik fareler üzerinde çalışırken beklenmedik bir şekilde demirin aşırı yüklenmesi oluşmuştur. Bu farelerde UFS2 geni yerine hepsidin geninin bozulduğunu bulmuşlardır.^{13,14}

Pigeon ve arkadaşları ise demir upregulasyonu geni ile ilgili araştırma yaparken, farelerde demir eksikliğinde azalan ve demir yüklenmesinde artan hepsidin mRNA'nın farelerde eksprese olduğunu bulmuşlardır.¹⁴

2.2.Hepsidin Fizikokimyasal Yapısı

İnsan idrar ve kanında bulunan farklı moleküler ağırlıkta 3 predominant hepsidin formu bulunmuştur.^{15,16}

İnsan hepsidin geni 19. kromozomun (HAMP geni) uzun kolunda (19q13) lokalizedir. Hepsidin geni 2 intron 3 ekson içerir ve 0.4kb'lık mRNA'ya transkripte olur. Buda 84 aminoasitlik öncü protein pre-prohepsidini kodlar.^{14,15,17,18,19}

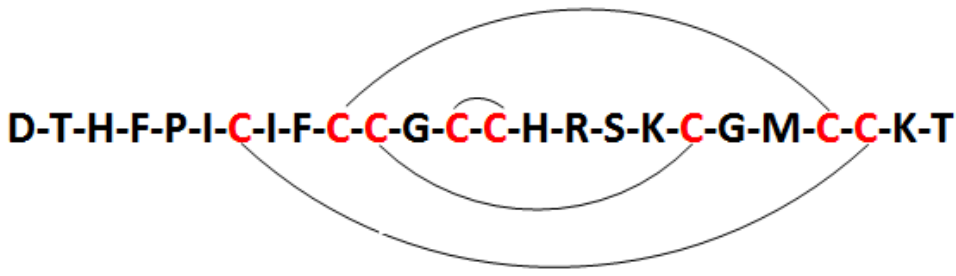
Pre-prohepsidin, furin proprotein konvertaz ile 64 aa'lık pro-hepsidine dönüşür ve endoplazmik retikulum lümenine aktarılır. Daha sonra 39 aa'lık öncü peptidin post-translasyonel olarak ayrılması sonucu, 25 aa'lık biyoaktif hepsidin-25 oluşur.^{11,12,16,20}

Bu aminoasit dizisinde 8 sistein aminoasidi 4 disülfid bağı ile bağlı bulunur (şekil 1).¹²

Sisteinden zengin hepsidin peptitleri 4 disülfid köprüsü ile bağlanmış U şeklinde kıvrılmış 2 koldan oluşan bir yapıdır. Nadir görülen komşu iki sistein arasındaki disülfid bağı, peptidin U şeklinde dönmesini sağlar. Yaygın disülfid bağları ile karşılaştırıldığında, bu bağ molekülde bir gerilim oluşturur ve büyük bir kimyasal reaktivite özelliği kazandırır.^{15,16,17,21}

25 aa'lik peptidin N-terminali biyolojik olarak aktif olan kısımdır.²²

Hepsidin molekülüne demir bağlandığı zaman molekülün üç boyutlu yapısı değişmektedir. Bu konformasyonel değişim hepsidinin demir metabolizmasındaki düzenleyici rolü ile ilişkilidir.²³



Şekil 1: İnsan hepsidin molekülünün ana formunun bir modeli ve aminoasit dizisi. Sekiz adet sistein aminositi arasındaki dört disülfid köprüsü, aminoasit dizisinde gösterilmiştir.^{15,21}

İdrarda ve serumda yapılan incelemelerde 3 adet ana hepsidin molekülünden bahsedilmiştir: 20, 22, 25 aminoasitten oluşan Heps20, Heps22 ve Heps25. Biyolojik olarak aktif form olan Heps25, Heps20 ile birlikte hem serumda hem de idrarda bulunabilirken, Heps22 sadece idrarda bulunur.²⁴

İdrar hepsidin konsantrasyonları 10-100 ng/ml aralığında değişmektedir.¹⁷

Olgun hepsidin normal serum düzeyleri hakkındaki kullanılabilir bilgiler güvenli değildir. Ancak 60 aminoasitlik prohepsidin'in serum konsantrasyonu ELISA ile saptanabilir, sağlıklı bir kişideki serum düzeyi ortalama 106 ng/ml dir.^{15,25}

Diğer antimikrobiyal ve antifungal peptidler gibi hepsidin amfipatik (yapısında hem hidrofobik hem de hidrofilik grubun bulunması) yapıdadır. Hepsidin antibakteriyal aktivitesi için vücutta ölçülen konsantrasyonlarından 10 kat daha fazla olması gerekmektedir.^{11,12}

Hepsidin'in kısmi eksikliğinden kaynaklanan hereditör hemokromatoziste Vibrio, Yersinia ve Listeria gibi atipik mikroorganizmalar ile enfeksiyonlarda artış görülebilmektedir.²⁶

2.3.Hepsidin Sentezi

Hepsidin çoğunlukla karaciğerde daha düşük oranda böbrek, iskelet kası, akciğer, mide, pankreas ve beyinde sentezlenir.^{14,15}

Karaciğerden sentezlenen hepsidin sayesinde demir emilimi ve salınımı kontrol altında tutulurken makrofajlarda, yağ hücrelerinde ve kalp kası hücrelerinde hepsidin yapımını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu durum hepsidin demir mekanizmasını kontrol etmek için vücuttaki birçok mekanizma ile iç içe olduğunu göstermektedir.^{10,27,28}

Kalpte hepsidin ekspresyonu hipoksi ve inflamasyona cevap olarak düzenlenir. Hepsidin'in interkalar disk bölgesinde bulunması ve hipoksiyle artması, bu bölgenin demir toksisitesine hassasiyetinin olabileceğini göstermekte ve interkalar diskteki hepsidin varlığı, demir fazlalığına karşı koruyucu rol oynadığını düşündürmektedir.¹⁰

Kulaksız ve arkadaşları karaciğerde yüksek hepsidin konsantrasyonunun sinüzoidlere ve merkezi venlere doğru azaldığını, hepatositlerin periportal bölgesinde yoğunlaştığını göstermişlerdir.²⁹

Kulaksız ve arkadaşları başka bir çalışmada da, hepsidinin böbrekte intrinsek olarak üretildiğini ve hepsidinin böbrekte demir transportunun düzenlenmesinde karmaşık bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır.³⁰

2.4.Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi

2.4.1.Demir ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi

Plazma demir düzeylerinin ve dokulardaki demir depolarının artışı ile uyarılan hepsidin sentezi, makrofajlardan ve duodenal enterositlerden plazmaya demir geçişini azaltmaktadır. Bu döngü, plazma demirinin sabit bir aralıkta tutulmasını sağlarken, aşırı demir emilimini ve dokularda demir birikimini önlemektedir.³

Farelerde oral veya parenteral demir yüklemesi hepatik hepsidin mRNA ekspresyonunu artırır. İnsanlarda tek doz oral demir alınması (65 mgr FeSO₄) birkaç saat içinde üriner hepsidin ekskresyonunu artırır. Artmış plazma hepsidin düzeyi demirin intestinal emilimini ve depolardan salımını inhibe eder. İn vitro primer fare veya insan hepatositlerine veya insan hepatik hücre serilerine demir yüklemesi, hepatositlerin Fe⁺²-transferrin veya demirin diğer formlarıyla yüklenmiş olması farketmeksizin hepsidin mRNA'sını arttırmaz. Hepsidin demir regülasyonu ile ilgili bilgiler hereditör hemokromatozis gen çalışmalarından elde edilmiştir. Demir aşırı yüklenmesine rağmen homozigot HFE (Human hemochromatosis protein), transferrin reseptör-2 ve hemojuvelin (HJV) mutasyonu olan hastalarda veya farelerde hepsidin oranı düşük bulunmuştur. Sonuç olarak bu moleküllerin demir bağımlı olarak hepsidin sentezini düzenlediği gösterilmiştir.^{3,31}

2.4.2. Hipoksi ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi

Hipokside hepsidin sentezi azalmaktadır. Nicolas ve arkadaşları hepsidini kodlayan genin anemi, hipoksi ve inflamasyon tarafından düzenlendiğini bulmuşlardır.³²

Yine bu çalışma göstermiştir ki, hepsidin sentezinin azalmasını hipoksi tek başına tetikleyebilir ve 5500 m yüksekliği taklit eden hipobarik hipoksi odalarında barındırılan farelerde hepsidin hızlı bir şekilde azalır.³³

Hipoksi ile uyarılabilir faktör (HIF) yolağındaki değişiklikler hepsidin ekspresyonunu etkilemektedir. Farelerde VHL/HIF (Von Hippel–Lindau/hypoxia-inducible transcription factor) yolağının engellenmesi ile eritropoietin ve ferroportin mRNA ekspresyonunda azalma ve hepsidin mRNA ekspresyonunda artma gözlenmiştir. VHL/HIF yolağı eritrosit üretimini desteklemek için demiri mobilize eder.³⁴

Hipoksi, yetişkin böbreği ve fetüs karaciğeri tarafından yapılan eritropoietin üretimi için birincil düzenleyici sinyaldir. Eritropoietin'in karaciğer hepsidin gen sentezini azalttığı rapor edilmiştir.³⁵

Hipoksida hepatik hepsidin gen ekspresyonu azalırken, kardiyak hepsidin gen ekspresyonu belirgin olarak artmıştır. Kalpte hipoksi ile hepsidin sentezinin indüklenmesi, artmış ferritin (Ferritin intrasellüler Fe depolayan major proteindir, önemli hücre koruyucu rolü vardır. Hücre içi serbest demir konsantrasyonunu kontrol eder ve hücreyi serbest O₂ radikallerinden korur) ve azalmış serbest O₂ radikalleri ile kalpte koruyucu bir görev üstlenmekte olduğunu göstermektedir.¹⁰

2.4.3.Anemi ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi

Aneminin, hepsidini iki yolla etkileyebileceği düşünülmektedir. Bunlar, hepsidin gen ekspresyonunu düzenleyen muhtemel bir HIF' in yer aldığı doku hipoksisi ve eritropoezi uyararak indirekt olarak hepsidin sentezini baskılayan transferrin satürasyonunun azalmasıdır.²¹

Hangi yolla olursa olsun, hepsidin sentezi talasemiler gibi etkili olmayan eritropoezle giden hastalıklarda eşlik eden demir yüklenmesine rağmen azalmış olarak bulunur. Bu durum hepsidin üretiminin anemi ile baskılanmasının, hepsidin sentezinin demir yüklenmesi ile uyarılmasına kıyasla daha güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.²¹

2.4.4.İnflamasyon ve infeksiyon ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi

Hepsidin sentezi inflamasyon ve infeksiyon tarafından hızlıca arttırılmaktadır. IL-6'nın bu artıştan sorumlu uyarıcı olduğu çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında gösterilmiştir.^{36,37}

IL-6 infüzyonu yapılan gönüllü kişilerde saatler içerisinde idrarda hepsidin atılımının 7.5 kat arttığı, bu artışa serum demiri ve transferrin saturasyonunda %30 azalmanın eşlik ettiği görülmüştür.⁴

Nemeth ve ark.'nın 2003 yılında yaptığı bir çalışmada, transfüzyona bağlı demir yüklenmesi, infeksiyonu ve inflamatuvar hastalığı olan hastalarda idrarda hepsidin atılımını belirgin olarak arttırmış, in vitro IL- 6 ile hepsidin mRNA'sının belirgin olarak indüklendiği gözlenmiştir.³⁸

Başka bir çalışmada IL-6 infüzyonu yapılan insanlarda üriner hepsidin atılımı infüzyondan sonra 2 saat içinde birkaç kat artmıştır.³⁹

IL-6, STAT-3 bağımlı transkripsiyon mekanizması ile hepsidinin kuvvetli bir indükleyicisidir.⁴⁰

Kemna ve ark. 2005 yılında 10 sağlıklı gönüllüye lipopolisakkarid (LPS) enjeksiyonu yaparak oluşturdıkları in vivo insan endotoksemi modelinde, enjeksiyon sonrası 3. saatte IL- 6 düzeylerinin, 6 saatte idrar hepsidin düzeylerinin arttığını, bunu takiben serum demir düzeylerinin belirgin olarak azaldığını gözlemlemiştir.³⁷

IL-6 geni çıkartılmış farelerde yüksek hepsidin mRNA düzeyleri diğer sitokinlerin de hepsidin regülasyonunda rol oynadığını göstermektedir. IL-1, IL-6'dan bağımsız olarak fare karaciğerinde hepsidin mRNA'sında artışa neden olmaktadır.⁴¹

Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, IL-6 - hepsidin aksının hipoferremik cevapta kritik bir öneme sahip olduğu ve hepsidinin inflamasyonla ortaya çıkan hipoferremide rol alan temel aracı olduğunu göstermektedir.

2.4.5.Eritropoetik Aktivite ile Hepsidin Sentezinin Düzenlenmesi

Hepsidin inefektif eritropoezin olduğu anemilerde (demir eksikliği anemisi, hemolitik anemi gibi) azalmıştır.⁴²

Kanama veya hemoliz ile oluşturulan fare anemi modellerinde hepsidin baskılanması eritropoetik aktiviteye bağımlıdır. Eritropoezis sitotoksik ajanlar veya radyasyona bağlı inhibe edildiğinde ciddi anemiye rağmen hepsidin mRNA'sında azalma görülmemektedir.⁴²

İnefektif eritropoezdeki hepsidin baskılanmasından eritroid prekürsörleri tarafından oluşturulan growth differentiation factor 15 (GDF15) ve twisted gastrulation protein 1 (TWSG1) sorumlu tutulmaktadır.⁴³

2.5.Hepsidin Etki Mekanizması ve Kinetiği

Hepsidin makrofajların ve enterositlerin hücre membranlarındaki demir taşıyıcılarını azaltarak demir emilimini ve salınmasını baskılar.⁴⁴

Hepsidin geninin deneysel olarak demir yüklenmiş farelerin karaciğerinde aşırı yapıldığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda hepsidin geni eksik (knockout) farelerde demir aşırı yüklemesinin olduğu gösterilmiştir.¹³

Hepsidin enjekte edilmesi bağırsaktan demir emilimini inhibe etmektedir.⁴⁵

Hepsidin transmembran demir taşıyıcısı olan ferroportine bağlanır ve inhibe eder. Ferroportin enterositlerin bazolateral ucunda, makrofajlarda ve karaciğerde, plasental trofoblastlarda ve eritrosit prekürselerinde bulunmaktadır.^{46,47}

De Domenico ve ark hepsidin'in ferroportin'in internalizasyonunda ve yıkımında rol oynadığını göstermişlerdir.⁴⁸

Büyük bir kısmı serumda, karaciğerden salınan α -2 makroglobuline bağlı taşınan hepsidin'in atılım yolu idrardır.⁴⁹

İnsanlarda demir alımının olması idrarda hepsidin düzeyini arttırmıştır. Nemeth ve ark'nın 2004'te yaptığı çalışmada 3 günlük oral demir alımının 24 saat sonrasında üriner hepsidin miktarında şiddetli bir artış olmuş sonrasında demir alımının devamına rağmen normal değerlere düşmüştür. İdrardaki hepsidin yüksek değerlere ulaşması kandan hepsidin hızla uzaklaştırıldığını gösterirken, demir emilimindeki inhibitör etkisinin devam ettiği bulunmuştur.³⁶

Farelere intraperitoneal hepsidin enjeksiyonu sonrasında serum demir seviyeleri 1. saatte % 80 azalma göstermekte ve bu durum 48 saatten uzun sürmektedir. Hepsidin'in ferroportin yönünden zengin organlar olan karaciğer, dalak ve proksimal duodenumda biriktiği gözlenmiştir.⁵⁰

Bütün bu gözlemler makrofajlardan demir salınımında ve bağırsaklardan demir emiliminde hepsidin'in negatif düzenleyici rol oynadığını göstermiştir.⁵¹

Transgenik fare modellerinden elde edilen kanıtlar hepsidin etkin negatif düzenleyici olduğuna işaret etmektedir.²¹

Hepsidin'in net etkisi; diyetle alınan demir emilimini azaltmak, makrofajlardan ve karaciğerdeki depolardan demirin salınımını azaltmaktır. Doğal olarak hepsidin ortamda olmadığına enterositler ve makrofajlardan demir salınımı üzerindeki negatif etkinin kaybolmasına bağlı dolaşımda aşırı demir yüklenmesi olur.⁵¹

2.6.Miyokardial İskemi-Reperfüzyon (İ/R) Hasarı

Miyokardial iskemi, miyokardın metabolik gereksinimlerine göre, yetersiz kan akımı ile karakterize bir durumdur. Başka bir ifade ile koroner kan akımında azalma sonucu kalbin oksijen ve besin desteğinin azalmasıdır.^{52,53}

Miyokarda oksijen sunumu ve ihtiyacı arasındaki dengesizlik sonucu oluşan iskemi, dokuda hipoksi ve anaerobik metabolizmaya yol açar.⁵²

İskemiye bağlı olarak mitokondriyal enerji üretimi azalır, laktat üretimi artmaktadır. Bu metabolik değişiklikler; hücre içi pH'da azalma, hücre içi Na⁺ ve Ca²⁺ konsantrasyonlarında artma ve membranda depolarizasyon ile sonuçlanmaktadır.⁵⁴

Reperfüzyon, iskemiye maruz kalan doku ya da organların yeniden kanlanması ve oksijenlenmesi olayıdır. Reperfüzyon hasarı ise iskemi periyodunu izleyen yeniden kanlanma döneminde doku ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır.⁵⁵

Reperfüzyondan dolayı ortaya çıkan hücresel hasar; iskemik olayın süresine bağımlı olarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir. Yirmi dakikalık iskemi periyodunu takip eden dönemde reperfüzyonun oluşturduğu hasar geri dönüşlüdür fakat daha uzun sürelerdeki iskemiye takip eden reperfüzyon miyokardiyal hasar ya da hücresel nekrozla sonuçlanır.⁵⁶

Hücre içine moleküler oksijen sunumuyla hızla oluşan serbest oksijen radikal türevleri en çok suçlanan faktör olmakla birlikte reperfüzyon hasarından birçok mekanizma sorumlu tutulmuştur.^{55,57,58,59}

İskemi ile reperfüzyon hasarını birbirinden kesin sınırlarla ayırmak mümkün olmadığından hasar, genellikle iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı olarak tanımlanır.⁶⁰

İ/R hasarı; miyokard enfarktüsü, beyin iskemi, inme, hemorajik şok, organ transplantasyonu gibi cerrahi müdahaleler ve trombolitik tedaviye bağlı oluşan patofizyolojinin temelinde yatar.⁶¹

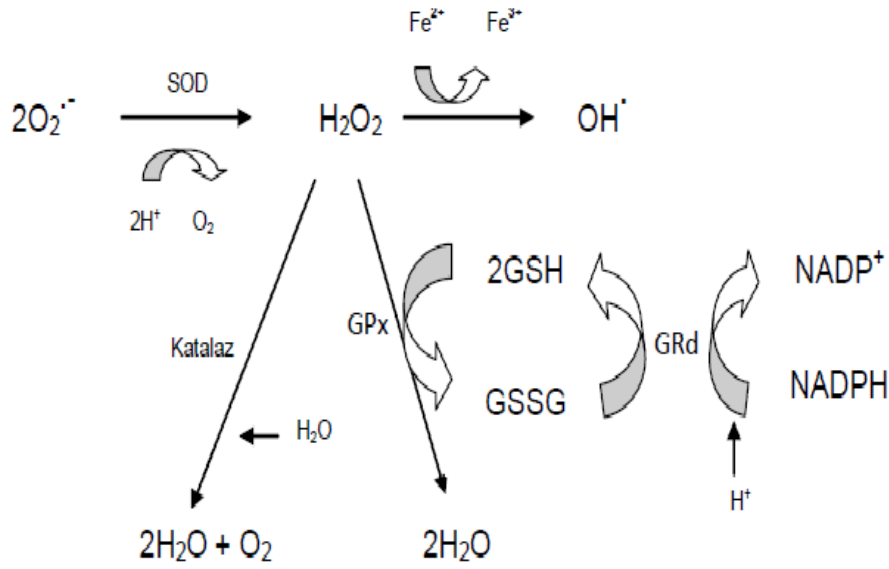
2.7.Kalp İskemi-Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları

Serbest oksijen radikalleri, İ/R sırasında miyokard da hızlı bir şekilde oluşmaktadır ve İ/R hasarının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir.⁶²

Reperfüzyonun başında mitokondriyal solunum hızı ve serbest radikal üretimi belirgin derecede artar. Bu radikaller hücredeki serbest radikal yakalayıcı sistemlerin kapasitesini asabilir ve hücrel disfonksiyona yol açabilirler. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, %5'inin ROS' a çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH\cdot$), peroksinitrit ($ONOO^-$) vardır. Bu maddeler; membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedirler (Sekil-2).⁶³

Mitokondriler, ksantin oksidaz enzimi, prostaglandin (PG) biyosentezi ve inflamatuvar cevapta rol oynayan fagosit hücreler (nötrofil ve monosit) serbest radikallerin kaynağı olarak bilinirler. Bakır, demir, manganez ve molibden gibi geçişli metaller de reaksiyonları katalize ettikleri için serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Reaktif oksijen ürünleriyle reaksiyona giren endojen bileşikler olan antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRd) ile inflamatuvar hücrelerin serbest radikal üretimini engelleyen ekzojen ajanlar (ibuprofen ve allopurinol gibi) doku hasarını azaltabilirler.⁶⁴

SOD; $O_2^{\cdot-}$ anyonunu daha az toksik olan H_2O_2 ve O_2' e çevirir. KAT; H_2O_2 'i H_2O ve O_2' e dönüştürür. GPx; yaşamsal fonksiyona sahip diğer bir antioksidan enzimdir. Lipit ve lipid olmayan hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu sağlar. İndirgenmiş glutatyon (GSH) varlığında H_2O_2 'den H_2O ve okside glutatyon (GSSG) oluşturur. Oluşan GSSG; GRd ile tekrar GSH oluşturmak için NADPH gerektiren döngüye girer. İskemi süresince NADPH azalır ve reperfüzyon sırasında NADPH düzeyi iskemi öncesi düzeye ulaşamaz. Bundan dolayı düşük NADPH ve yüksek GSSG konsantrasyonları, reperfüzyon sırasında GRd' in antioksidan aktivitesinin azalmasına neden olur.⁶⁵



Şekil 2: Oksidan ve Antioksidan sistemler.

Oksidatif stres çalışmalarında, organizmada serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için çeşitli biyolojik materyallerde lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan ürünlerin konsantrasyonları sıklıkla ölçülmektedir. ROT'in başlattığı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler oluşur. Lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler de daha sonra alkan aldehytler, hidroksil aldehytler, MDA ve uçucu hidrokarbonlar oluşturmak üzere parçalanırlar. MDA ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan testtir. MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır.⁶⁶

2.8.Nitrik oksit (NO)

Hem iskemi hem de reperfüzyonu takiben zarar gören endotelyumda NO sentezi belirgin derecede azalır. NO trombositlerin homotipik (platelet-platelet) ve heterotipik (platelet-lökosit) agregasyonunu ve lökosit-endotel hücre adezyonunu inhibe eder. NO gibi inhibitör etkisi çok kuvvetli bir ajanın eksikliği nötrofil aktivasyonunun kolaylaşmasına ve doku hasarının artmasına yol açar.^{67,68}

İskemiden önce NO ve NO donorlerinin uygulanması ile infarkt alanı ve endotelial disfonksiyon gibi İ/R' un neden olduğu miyokardiyal hasar azaltılabilir.⁶⁹

Ekzojen NO ve NO donorlerinin yararlı etkilerinin bir kısmı İ/R sırasında nötrofillerin vasküler endotelyuma yapışmasını engellemeleri aracılığıyla olmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki NO' in kalp kası hücre fonksiyonunu baskılaması, İ/R' u takiben inflamatuvar süreçleri uyarması, mitokondriyal solunumu bozması, nekroza ve apoptoza neden olması gibi birçok zararlı etkisi de vardır. Ancak düşük konsantrasyonlardaki NO kalp kası hücre fonksiyonunu artırır. İ/R'u takiben trombosit agregasyonunu ve nötrofil-endotelyum etkileşimlerini azaltır.⁶⁹

Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve ONOO'in reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazla olduğu ve bu durumun iNOS up-regülasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. NO düzeyindeki bu gecikmiş artış, doku hasarının daha da artmasına neden olur. Wildhirt ve arkadaşları, selektif iNOS inhibisyonunun koroner kan akımı, hücrel infiltrasyon, nekroz, infarkt alanı ve miyokard performansı üzerinde koruyucu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir.⁷⁰

2.9.Kalp Fizyolojisi

Kalp; sağ ve sol atriyum ve ventriküller olmak üzere 4 boşluktan oluşur. Bu boşlukları birbirinden ayıran bölmelerin dış duvara tutunduğu yerlerde oluklar bulunur. Bu oluklardan atriumlarla ventrikülleri birbirinden ayırana taç' a benzediği için sulkus koronarius denilir. Sulcus koronariusun içerisinde kalbi besleyen damarların ana bölümleri ile sinus koronarius bulunur. Sol atriya, sağ ve sol vena pulmonalisler açılır. Sağ atriya, vena kava superior, vena kava inferior ve kalbin venöz dolaşımının yaklaşık %60' ını toplayan sinus koronarius boşalır.^{71,72}

Kalp kası, beyin hariç diğer organlardan daha fazla oksijene gereksinim duymaktadır. Kalp kası, içinde bulunan kandan direkt olarak yararlanamaz. Kalbi besleyen damarlar arteria koronarius olarak adlandırılır ve aortadan direkt çıkarlar. Koroner arterlerle gelen kan, vena kordis aracılığıyla sağ atriya dökülür. Kalbin pompaladığı tüm kanın %5-10' u (günde 380 litre) kalp duvarının beslenmesi için kullanılır. Sağ ve sol olmak üzere iki adet olan koroner arterler aortanın başlangıcından çıkarlar. Sağ koroner arter, aortadan çıktıktan sonra önce sağ atrium ve ventrikül arasındaki olukta (sulkus koronarius), daha sonra kalbin alt yüzünde interventriküler olukta ilerler. Sol koroner arter, aortadan çıktıktan sonra önce trunkus pulmonalis ile sol aurikula arasında ilerler, daha sonra interventriküler ve sirkumfleks dalına ayrılır. Koroner arterlerle kalp duvarına gelen kanın 2/3'ü koroner arterlere eşlik eden venlerle, sinus koronarius oradan da sağ atriya akar. 1/3'lük kısım ise Galenos ve Thebesius venleri ile geri döner.⁷³

Kalp duvarı üç tabakadan oluşur: Endokardiyum, Miyokardiyum, Epikardiyum (Perikardiyumun visseral yaprağı). Epikardiyum dışında perikard boşluğu bulunur ki, kalp bu boşluk içinde yer alır.⁷⁴

Kalp kasını oluşturan kas telleri bazı yönleri ile iskelet kasına, bazı yönleri ile de düz kas tellerine benzerler. Miyofibrillerin enine çizgili olmasından, bandlaşma göstermesinden dolayı, iskelet kası tellerine benzerlerken, kas tellerinin tek çekirdek içermeleri ve bu çekirdeklerin, tellerin santraline yerleşmeleri bakımından da, düz kaslara benzer. Kas tellerinin kollaterallerle ve özel bir biçimde peş peşe birbirlerine bağlanmaları, diğer kas tellerinde bulunmayan özellikleridir. Böylece kalp kası, üç boyutlu bir ağ sistemi meydana getirir. Bunların birbirlerine bağlandıkları yerler, ışık mikroskopunda, Z bandlarından daha kalın diskler halinde görünürler. Bu diskler interkalat diskler diye isimlendirilirler. Bağlantı yerlerinden her biri, çoğunlukla, merdiven basamakları görünümünde olan birkaç disk içerirler. Bu bağlantı yerleri aynı zamanda uyarımlarında hücreden hücreye geçmelerini sağlarlar. Bağlantı yerlerine en belirgin olarak papiller kaslarda rastlanır.⁷⁵

İnsan kalbinde; üst vena kava ile sağ atriyum kavşağında sino-atriyal (SA) düğüm yer alır. Atriyo-ventriküler (AV) düğüm ise, interatriyal septumun sağ arka bölümünde bulunur. AV düğümü, normalde atriyumlarla ventriküller arasındaki tek iletim yoludur. AV düğümü, interventriküler septumun tepesinde sol demet dalını veren ve sağ demet dalı olarak devam eden his demetiyle devam eder. SA düğümünde başlayan depolarizasyon atriyumların içinde ışınal olarak dağılır ve daha sonra, AV düğümünde bir araya gelirler. Atriyal depolarizasyon yaklaşık 0.1 saniyede (sn) tamamlanır. AV düğümünde iletim yavaş olduğu için uyarı ventriküllere yayılmadan önce 0.1 sn bir gecikme olur. Septumun tepesinden, depolarizasyon dalgası, hızlı iletim yapan purkinje liflerinde dağılarak ventriküllerin her yerine 0.08-0.1 sn'de ulaşır. Kalbin fonksiyonunu düzgün bir şekilde devam ettirebilmesi için ileti sistemi, uyarılabilirlik (ekstabilite), kontraksiyon gibi niteliklerinin bozulmamış olması gerekir. Bu da, kalbi besleyen kan akımının devamına bağlıdır. Kan akımının azalması veya durması kontraksiyonların bozulması (miyokard sersemlemesi; myocardial stunning), aritmiler ve MI gibi çeşitli istenmeyen önemli durumlara yol açar.⁷⁶

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları

Çalışma için Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 01/2010-56 sayılı kararı ve 02.07.2010 başlama tarihi ile onayı alınmıştır. Grupları oluşturmak amacıyla Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilen 12 adet 250-300 gram arası Wistar albino sıçanlar kullanıldı.

3.2. Kullanılan Cihazlar

1- Langendorff Sistemi

İzole perfüze kalp preparatı ilk kez Oskar Langendorff isimli bir Alman doktor tarafından tanımlanmıştır. Fizyolojik, farmakolojik ve biyokimyasal araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bu yöntem, bugüne kadar pek çok modifikasyona uğramıştır. En çok akut ilaç etkilerini araştırmak için kullanılsa da önceden belli bir uygulamaya tabi tutulmuş hayvanların kalplerindeki değişiklikler ve ilaçların kalbe etkileri de incelenebilmektedir. Pek çok izole organ preparatının aksine aynı anda çok sayıda parametrenin izlenmesine olanak sağlamaktadır. Parametreler kalbin doğal mekanizmalarına bırakılabileceği gibi, her parametreyi ayrı ayrı belirleme olanağı da vardır.⁷⁷

- 2- Sıvı iyon miktarı analizi (İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi / ICP-OES)
- 3- Hassas Terazî (Sartorius Basic)
- 4- Vorteks (Nüve NM 110-02488)
- 5- Doku Homojenizatör (Sonics Vibra-Cell VCX130FSJ)

- 6- Santrifüj (High Speed Brushless Centriuge MPW350R)
- 7- Su Banyosu (Guft DBS 12734)
- 8- Spektrofotometre (ELISA) (BioTek ELx405 Washer- Synergy HT Reader- Gen5 Data Analysis Software)
- 9- Çeşitli aralıklarda mikropipet
- 10-Deiyonize Saf Su Cihazı (mes ro/di controller-MC08)
- 11-Viskozimetre (BioProfiler Vilastic)
- 12-Ultrasonik Karıştırıcı Banyo (transsonic 660/H)

3.3.Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1- 10^{-5} M Hepsidin
- 2- 60 mg/kg ip Ketamine HCl
- 3- 118 mM NaCl
- 4- 4,7 mM KCl
- 5- 1,5 mM CaCl_2
- 6- 1,2 mM KH_2PO_4
- 7- 1,2 Mm MgSO_4
- 8- 25,2 mM NaHCO_3
- 9- 11,1 mM Glükoz
- 10-250 μl 0,3 N NaOH
- 11-250 μl %10'luk ZnSO_4
- 12-1 birim VaCl_2
- 13-0,5 birim NEDD
- 14-%10'luk TCA
- 15-10 μl %1'lik BHT
- 16-750 μl TBA

17-1000 µl 0,3 M Na₂HPO₄

18-125 µl DTNB

3.4.Cerrahi İşlem

Ketamine HCl (60 mg/kg ip) ile anestezi altına alınan 250-300 gr. arası yetişkin Wistar-Albino sıçanların göğüs kafesleri cerrahi olarak açıldı. Kalbin çevresindeki perikard tabaka sıyrılarak, aort ve pulmoner damarlar kesildi, kalp hızla çıkarıldı. Buz soğukluğunda Krebs-Henseleit içeren petri kabına alınan kalpler, hızla aortadan kanüle edilerek Langendorff sistemine bağlandı. 37°C deki Krebs-Henseleit (KH) solüsyonu ile pefüze edildi.

3.5.Çalışma Grupları

Denekler 2 gruba ayrıldı.

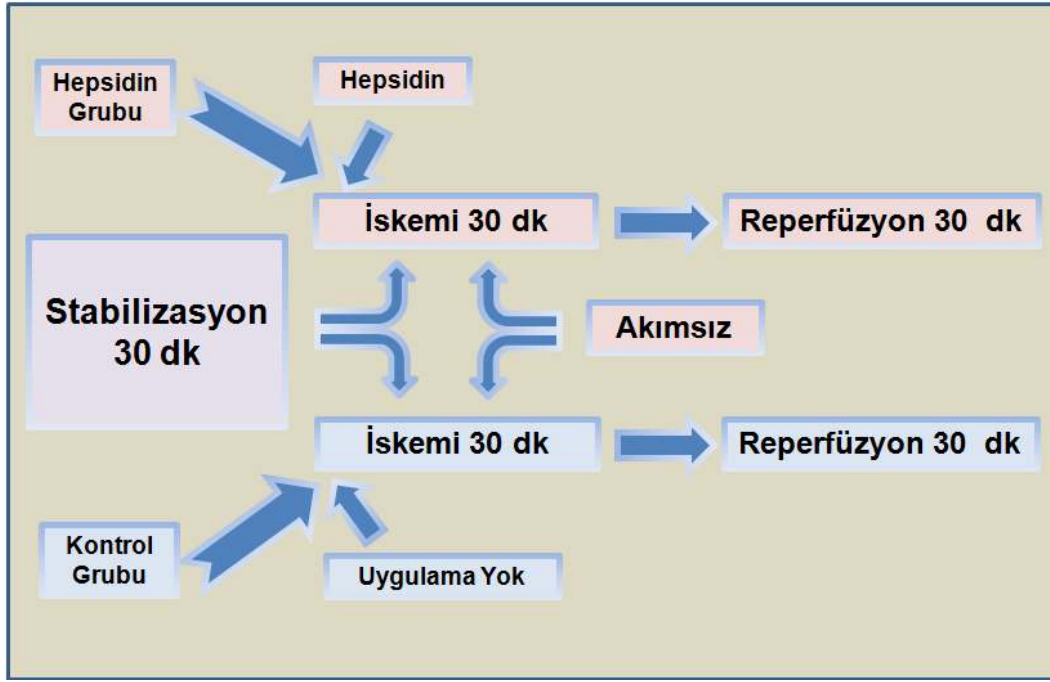
Kontrol (İ/R) Grubu (n=6)

Hepsidin Grubu (n=6)

3.6.Çalışma Protokolü

Kalpler 30 dakika stabilizasyon, 30 dakika iskemi ve 30 dakika reperfüzyon süreçlerine tabi tutuldular. Hepsidin grubuna; iskeminin hemen başlangıcında Hepsidin (10⁻⁵ M) Krebs-Henseleit solüsyonu içinde uygulandı. Kontrol (İ/R) grubuna sadece Krebs-Henseleit solüsyonu uygulandı.

Miyokard performansı, doku ve perfüzatta nitrit (NO^{2-}) ve nitrat (NO^{3-}) olarak NO_x düzeyi, doku da lipid peroksidasyonu göstergesi olarak MDA, antioksidan kapasite göstergesi olarak GSH düzeyi ölçüldü.



Şekil 3: Deney Protokolü.

3.7. İzole Perfüze Kalp

Krebs- Henseleit (KH) solüsyonu (mM) 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,5 mM CaCl_2 , 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 25,2 mM NaHCO_3 ve 11,1 mM Glükoz içermektedir. Langendorf sisteminde kalpler, aortadan kanüle edildikten sonra Krebs- Henseleit (KH) solüsyonu ile sabit hızda perfüze edilebilmektedir. Çalışmamızda Krebs- Henseleit solüsyonu % 95 O_2 ve %5 CO_2 geçirildi ve 37 °C'da sabit tutuldu.

3.8. Perfüzet ve Doku Çalışması

Kalpten çıkan sıvı (perfüzet) 1, 5, 10, 20, 30. dk.'larda ependorf tüplerine alındı ve biyokimyasal analiz için -20°C'da derin dondurucuda saklandı. Reperfüzyon sonunda kalpler derhal sıvı nitrojen ortamda donduruldu ve derin dondurucuda -80°C'da biyokimyasal analizler için saklandı. Perfüzetlerde NOx seviyeleri ölçüldü. Ayrıca MDA, GSH ve NOx seviyeleri kalp dokusunda tayin edildi.

3.9.Doku ve Perfüzet NOx (Nitrit ve Nitrat) Tayini

NOx seviyeleri, Griess yöntemi ile tayin edildi. Alınan doku 5 kat hacimde PBS ile sulandırıldı ve homojenize edildi. Homojenize işleminden sonra 2000 RCF de +4°C de 5 dakika santrifüje edildi. Daha sonra 500 µl süpernatant alındı ve üzerine 250 µl 0,3 N NaOH konularak oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. İnkübe işleminden sonra üzerine 250 µl %10'luk ZnSO₄ konuldu ve vortekslendi. Vorteks işleminden sonra 3000 RCF de +4°C de 5 dakika santrifüje edildi. Daha sonra 14000 RPM de +4°C de 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüje işleminden sonra 1 birim süpernatana 1 birim VaCl₂, 0,5 birim sülfanilamid ve 0,5 birim NEDD eklendi ve karışım 37°C de 30 dakika bekletildi. Örnekler 540 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okutuldu. Perfüzet örneklerine de aynı yöntem uygulandı ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okutuldu.⁷⁸

3.10. Doku Malondialdehit (MDA) Tayini

Alınan doku 9 kat %10'luk TCA ile sulandırıldı ve homojenize edildi. Homojenize işleminden sonra 3000 RCF de +20°C de 15 dakika santrifüje edildi. Santrifüje işleminden sonra süpernatant alındı ve 3000 RCF de +20°C de 8 dakika santrifüje edildi. Daha sonra cam tüpe alınan 750 µl örnek üzerine 10 µl %1'lik BHT konuldu. Karışıma 750 µl TBA eklendi ve 20 saniye vortekslendi. Vorteks işleminden sonra tüplerin ağzı cam misket ile kapatılarak 120°C de 15 dakika kaynatıldı. Karışım 3000 RCF de 8 dakika santrifüje edildi. Santrifüje işleminden sonra örnekler 535 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okutuldu.⁷⁹

3.11.Doku Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

Alınan doku 9 kat %10'luk TCA ile sulandırıldı ve homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra 3000 RCF de +20°C de 15 dakika santrifüje edildi. Santrifüje işleminden sonra süpernatant alındı ve 3000 RCF de +20°C de 8 dakika santrifüje edildi. Santrifüje işleminden sonra 250 µl örnek üzerine 1000 µl 0,3 M Na₂HPO₄ konuldu. Daha sonra üzerine 125 µl DTNB eklendi ve vortekslendi. Vorteks işleminden sonra oda ısısında 10 dakika bekletildi. Tüm işleminden sonra örnekler 412 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okutuldu.⁸⁰

3.12.Histolojik Değerlendirme

İskemi – reperfüzyon (İR) ve Hepsidin uygulaması yapılan kalp kası dokuları %10 luk formalin solüsyonunda, oda sıcaklığında 72 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin histolojik işlemlerden geçirildiler. Elde edilen paraffin bloklardan alınan 4-5 µm kalınlığındaki kesitler, Hematoksilen – eozin ve Masson-trikrom boyaları ile boyanarak Leica DM-4000B mikroskobu altında görüntülenerek, değerlendirildiler. Değerlendirmelerde, kalp kası liflerinin organizasyonu, kas liflerindeki enine çizgilenme, diskus interkalarisler, kalp kası liflerine ait çekirdeklerin yerleşimi ve kalp kası lifleri arası bağ dokusunun görünümü incelendi.

3.13.İmmunohistokimyasal Yöntem

İskemi-Reperfüzyon ve Hepsidin uygulaması yapılan gruplardan elde edilen paraffin bloklardan alınan kesitler, polilizinli lamlara aktararak (Caspase-9/LAP6 Ab-4) ile immunohistokimyasal olarak boyandılar. (Caspase-9/LAP6 Ab-4, Thermo Scientific). Kesitler, Leica DM-4000B mikroskop altında değerlendirerek, görüntülendiler. Bu yöntemle kalp kası liflerindeki immünreaktiviteye bağlı olarak apoptozisin varlığı incelendi.

3.14.Perfüzat Viskozitesi Tayini

Viskozimetre ile iskemi öncesi ve reperfüzyonun 1, 5,10, 20, 30. dakikalarında kontrol ve hepsidin grubuna ait toplanan perfüzatların viskoziteleri tayin edildi.

3.15.İyon Tayinleri

Sıvı iyon miktarı analizi Ankara Üniversitesi Yer Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde "İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometre" ile iskemi öncesi ve reperfüzyonun 1, 5,10, 20, 30. dakikalarında kontrol ve hepsidin grubuna ait toplanan perfüzetlerin içerdığı çeşitli elementler (demir, kalsiyum, magnezyum, potasyum, sodyum ve talyum) tayin edildi.

3.16.İstatistiksel Degerlendirme

Bilgisayarda 'SPSS; 15,0 for Windows' programı kullanılarak istatistiksel değerlendirme yapıldı. Kolmogorv-Smirnov testi uygulandı ve dağılımların normal olduğu görüldü. Gruplar arası farkları ANOVA varyans analizi ve iki grup arası farkı Independent-Samples T testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ($\bar{x}$), standart sapma (SD) olarak ifade edildi. $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

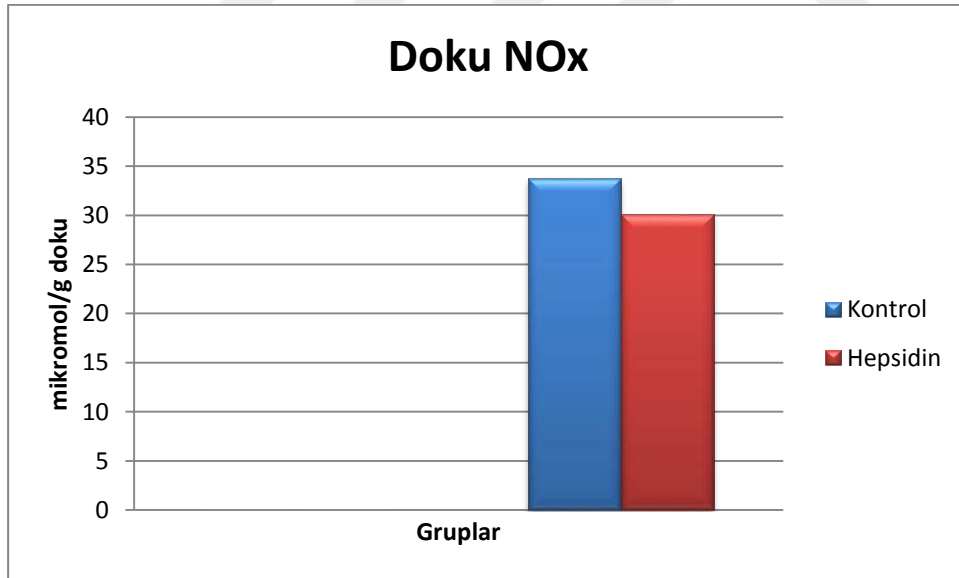
4.BULGULAR

4.1.Doku NOx Düzeyleri

Doku NOx düzeyleri, Hepsidin verilen grupta, Kontrol (İ/R) grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$). (tablo 1 ve şekil 4)

Tablo 1: Kalp dokusu NOx (Nitrit ve Nitrat) değerleri

Doku NOx (mikromol/g doku)	
Grup	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Kontrol(İ/R) (n=6)	$33,76 \pm 2,45$
Hepsidin (n=6)	$30,14 \pm 1,24$



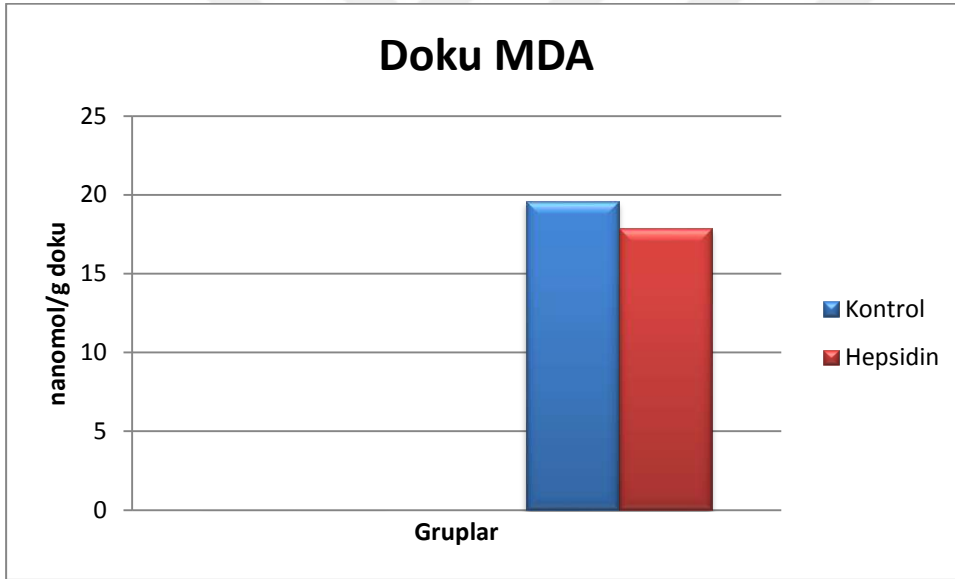
Şekil 4: Kalp dokusu NOx (Nitrit ve Nitrat) değerleri

4.2.Doku MDA Düzeyleri

Doku MDA düzeyleri, Hepsidin verilen grupta Kontrol (İ/R) grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$). (tablo 2 ve şekil 5)

Tablo 2: Kalp dokusu Malondialdehit (MDA) değerleri

Doku MDA (nanomol/g doku)	
Grup	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Kontrol(İ/R) (n=6)	$19,59 \pm 0,82$
Hepsidin (n=6)	$17,87 \pm 1,26$



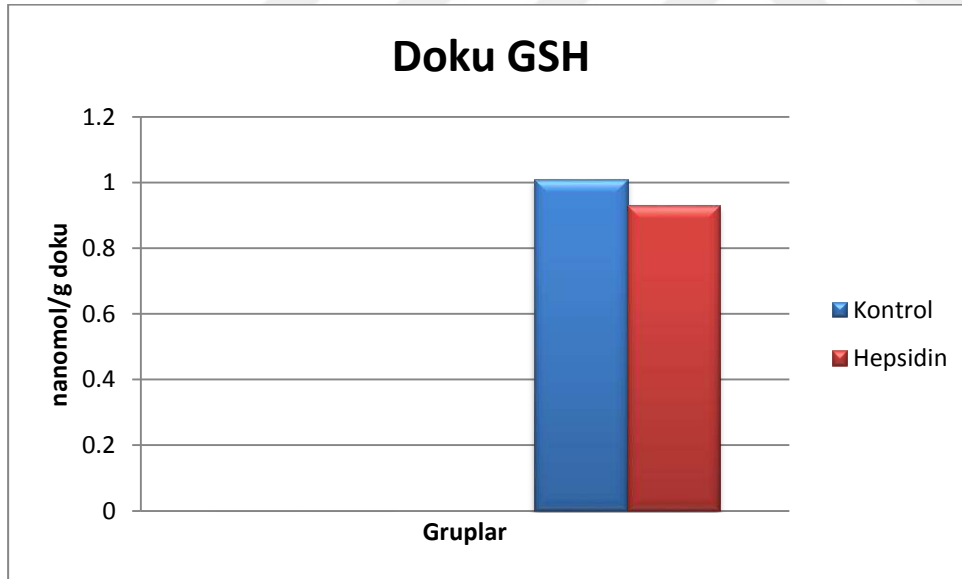
Şekil 5: Kalp dokusu Malondialdehit (MDA) değerleri

4.3.Doku GSH Düzeyleri

Doku GSH düzeyleri, Hepsidin verilen grupta Kontrol (İ/R) grubuna göre düşük bulundu. Ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). (tablo 3 ve şekil 6)

Tablo 3: Kalp dokusu Redükte Glutasyon (GSH) değerleri

Doku GSH (nanomol/g doku)	
Grup	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Kontrol(İ/R) (n=6)	$1,01 \pm 0,07$
Hepsidin (n=6)	$0,93 \pm 0,11$



Şekil 6: Kalp dokusu Redükte Glutasyon (GSH) değerleri

4.4.Perfüzat NOx Düzeyleri

NOx değerlerinde grup içi ve gruplar arası fark bulunmadı. (tablo 4)

Tablo 4: Kalp perfüzaı NOx (Nitrit ve Nitat) değerleri

Perfüzat NOx (nanomol/ml)		
	Kontrol(İ/R) (n=6)	Hepsidin (n=6)
	($\bar{x}$) $\pm$ (SD)	($\bar{x}$) $\pm$ (SD)
Preiskemi	18,32 $\pm$ 2,47	17,06 $\pm$ 1,44
1.dk	17,92 $\pm$ 1,63	17,06 $\pm$ 0,79
5.dk	17,98 $\pm$ 1,5	17,3 $\pm$ 0,76
10.dk	17,44 $\pm$ 1,44	17,6 $\pm$ 0,31
20.dk	17,7 $\pm$ 0,86	17,92 $\pm$ 1,46
30.dk	17,4 $\pm$ 1,11	17,3 $\pm$ 0,74

4.5.Perfüzat Viskozite Ölçümü

Viskozite değerlerinde grup içi ve gruplar arası fark bulunmadı. (tablo 5)

Tablo 5: Kalp perfüzaı viskozite değerleri

Perfüzat viskozite değerleri (santipoise)		
	Kontrol(İ/R) (n=6)	Hepsidin (n=6)
	($\bar{x}$) $\pm$ (SD)	($\bar{x}$) $\pm$ (SD)
Preiskemi	0,61 $\pm$ 0,18	0,72 $\pm$ 0,02
1.dk	0,76 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,01
5.dk	0,75 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,01
10.dk	0,71 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,01
20.dk	0,76 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,01
30.dk	0,72 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,02

4.6.Perfüzat Element Değerleri

Kalpten geçen sıvıdan (perfüzat) alınan örneklerle ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi) ile analiz yapıldığında Demir, Kalsiyum, Magnezyum, Potasyum, Sodyum ve Talyum da kontrol (İ/R) grubuna göre hepsidin grubunda daha düzgün iyon değerleri izlendi: Tablo 6,7,8,9,10,11.

Tablo 6: Kalp perfüzaatı Demir düzeyleri

Perfüzat Demir düzeyleri (ppm)		
	Kontrol(İ/R) (n=6)	Hepsidin (n=6)
	$(\bar{x}) \pm (SD)$	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Preiskemi	0,0 55 $\pm$ 0,004	0,055 $\pm$ 0,002
1.dk	0,0 54 $\pm$ 0,003	0,052 $\pm$ 0,007
5.dk	0,0 56 $\pm$ 0,002	0,056 $\pm$ 0,001
10.dk	0,057 $\pm$ 0,001	0,056 $\pm$ 0,003
20.dk	0,05 $\pm$ 0,01	0,056 $\pm$ 0,001
30.dk	0,052 $\pm$ 0,01	0,056 $\pm$ 0,001

Tablo 7: Kalp perfüzaatı Kalsiyum düzeyleri

Perfüzat Kalsiyum düzeyleri (ppm)		
	Kontrol(İ/R) (n=6)	Hepsidin (n=6)
	$(\bar{x}) \pm (SD)$	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Preiskemi	35,84 $\pm$ 0,47	36,45 $\pm$ 0,43
1.dk	36,13 $\pm$ 0,51	36,42 $\pm$ 0,32
5.dk	36,02 $\pm$ 0,41	36,12 $\pm$ 0,4
10.dk	36,25 $\pm$ 0,45	36,44 $\pm$ 0,58
20.dk	36,35 $\pm$ 0,65	36,6 $\pm$ 0,49
30.dk	35,84 $\pm$ 0,34	36,47 $\pm$ 0,48

30 dakikada Hepsidin grubunda Kontrol gruba göre anlamlı ($p<0.05$) düşüş görüldü.

Tablo 8: Kalp perfüzeatı Magnezyum düzeyleri

Perfüzeat Magnezyum düzeyleri (ppm)		
	Kontrol(İ/R) (n=6)	Hepsidin (n=6)
	$(\bar{x}) \pm (SD)$	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Preiskemi	26,01 $\pm$ 3,69	26,21 $\pm$ 0,98
1.dk	27,97 $\pm$ 1,68	26,2 $\pm$ 0,78
5.dk	27,81 $\pm$ 1,31	26,42 $\pm$ 2,55
10.dk	24,96 $\pm$ 5,41	25,78 $\pm$ 2
20.dk	27,08 $\pm$ 2,54	25,79 $\pm$ 1,66
30.dk	28,02 $\pm$ 1,9	26,6 $\pm$ 1,49

Tablo 9: Kalp perfüzeatı Potasyum düzeyleri

Perfüzeat Potasyum düzeyleri (ppm)		
	Kontrol(İ/R) (n=6)	Hepsidin (n=6)
	$(\bar{x}) \pm (SD)$	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Preiskemi	1513,19 $\pm$ 292,01	1551,86 $\pm$ 117,1
1.dk	1606,93 $\pm$ 136,03	1522,38 $\pm$ 115,19
5.dk	1665,41 $\pm$ 138,53	1605,22 $\pm$ 283,09
10.dk	1359,125 $\pm$ 665,75	1551,55 $\pm$ 129,85
20.dk	1611,45 $\pm$ 181,62	1489,26 $\pm$ 148,59
30.dk	1682,05 $\pm$ 243,9	1565,24 $\pm$ 140,13

Tablo 10: Kalp perfüzeatı Sodyum düzeyleri

Perfüzeat Sodyum düzeyleri (ppm)		
	Kontrol(İ/R) (n=6)	Hepsidin (n=6)
	$(\bar{x}) \pm (SD)$	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Preiskemi	15, 83 $\pm$ 1,24	15,4 $\pm$ 0,37
1.dk	15,25 $\pm$ 0,31	15,34 $\pm$ 0,22
5.dk	15,17 $\pm$ 0,22	15,53 $\pm$ 0,81
10.dk	16,79 $\pm$ 3,66	15,44 $\pm$ 0,35
20.dk	15,35 $\pm$ 0,38	15,57 $\pm$ 0,54
30.dk	15,19 $\pm$ 0,43	15,36 $\pm$ 0,24

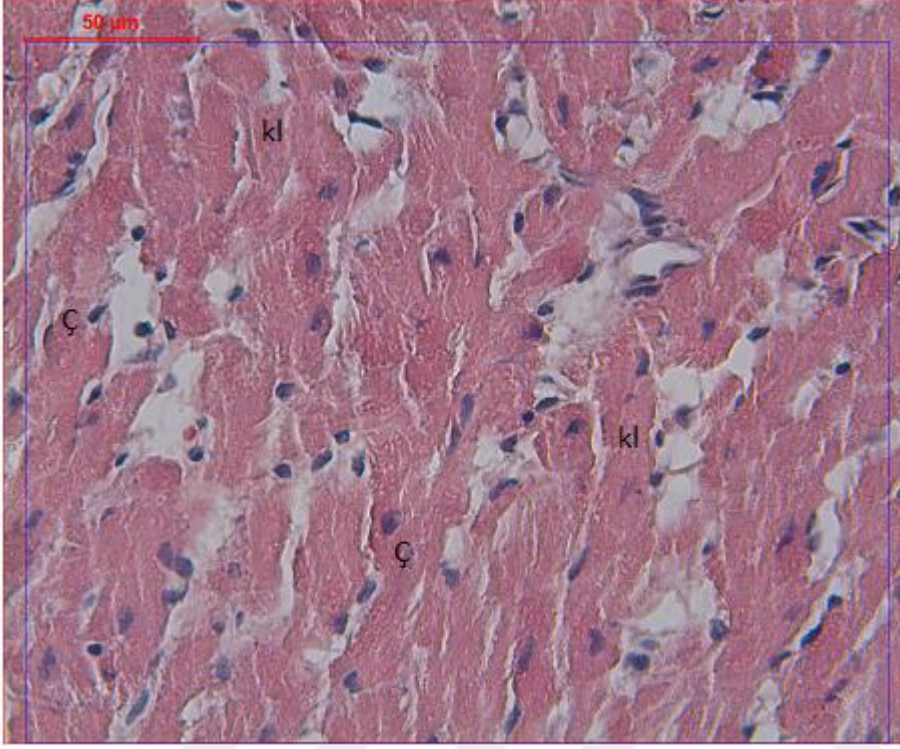
Tablo 11: Kalp perfüzeatı Talyum düzeyleri

Perfüzeat Talyum düzeyleri (ppm)		
	Kontrol(I/R) (n=6)	Hepsidin (n=6)
	$(\bar{x}) \pm (SD)$	$(\bar{x}) \pm (SD)$
Preiskemi	0,066 $\pm$ 0,003	0,065 $\pm$ 0,003
1.dk	0,067 $\pm$ 0,002	0,064 $\pm$ 0,002
5.dk	0,068 $\pm$ 0,002	0,066 $\pm$ 0,003
10.dk	0,066 $\pm$ 0,004	0,066 $\pm$ 0,005
20.dk	0,066 $\pm$ 0,003	0,066 $\pm$ 0,003
30.dk	0,068 $\pm$ 0,004	0,066 $\pm$ 0,001

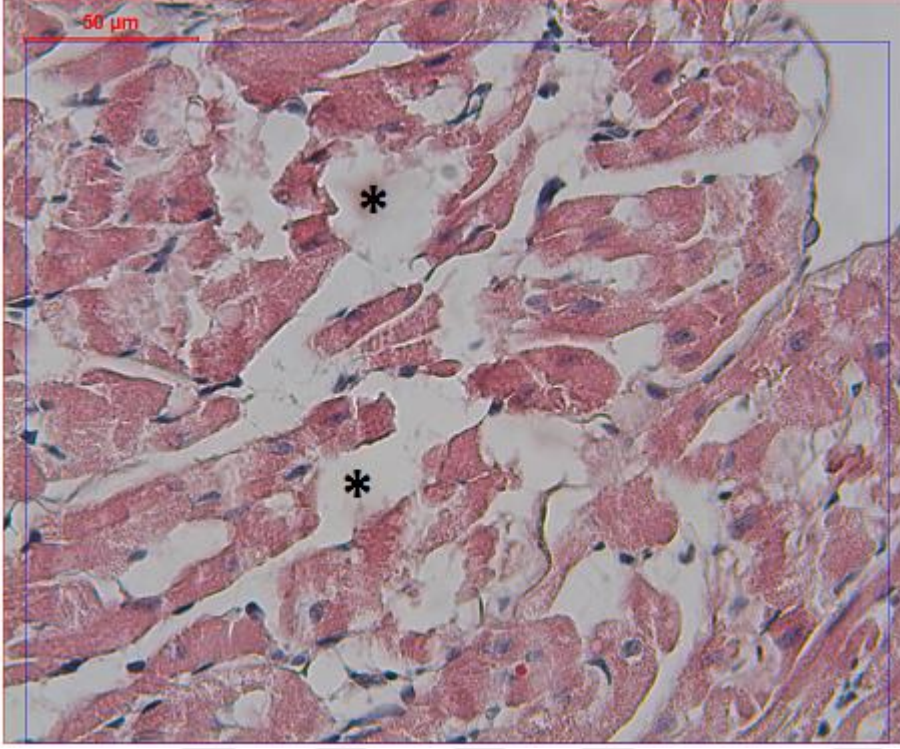
4.7.Histolojik Bulgular

Kontrol (İ/R) grubunun Hematoksilen – eozin, Masson-trikrom ile boyanmış kesitlerinde, kalp kası liflerinde disorganizasyon, enine çizgilenmenin belirgin olarak kaybolması, diskus interkalarislerin izlenememesi, kalp kas liflerine ait çekirdeklerin merkezi yerleşimlerinin bozulması dikkati çekti. Kas lifi demetleri arasındaki bağ dokusunda ödematöz alanların varlığı dikkati çekti. (Resim1,2,3)

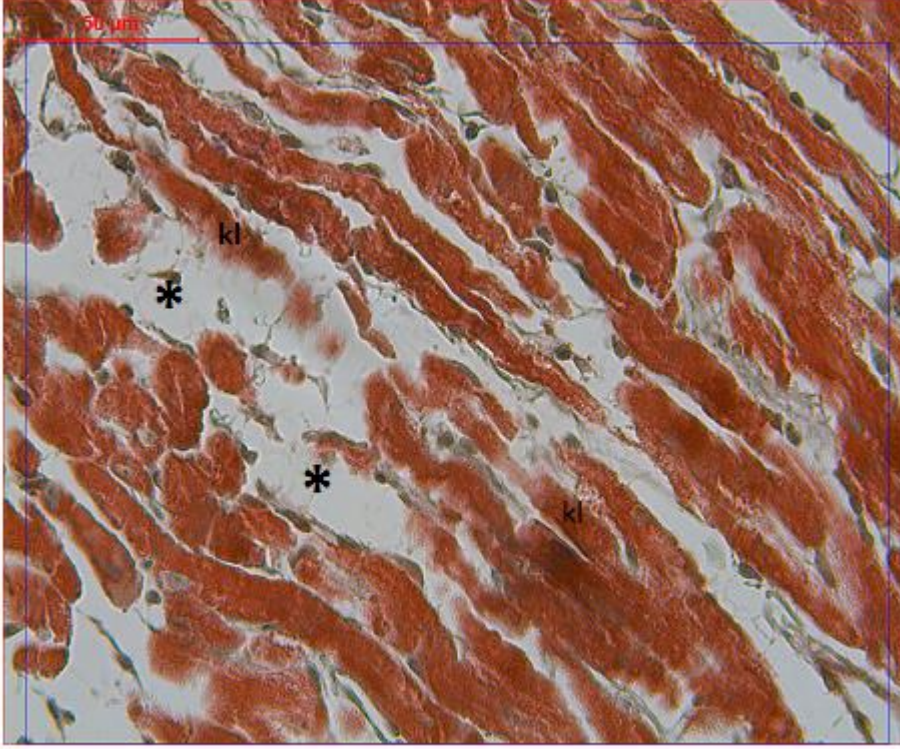
Hepsidin uygulanan grupta, belli alanlarda iskemi-reperfüzyon etkisinin hala devam ettiği ve kontrol (İ/R) grubu ile benzer görünümde olduğu, belli alanlarda ise normal kalp kası yapısına benzerlik gösteren doku özelliğinde olduğu görüldü. Normale yakın alanlarda kalp kası liflerinin, liflere ait çekirdeklerin organizasyonunda düzelme, enine çizgilenmenin ve diskus interkalarislerin düzenli olarak izlenmesi dikkati çekti. Kas lifleri arası bağ dokusu normale yakındı ve ödematöz alanlar içermemekteydi.



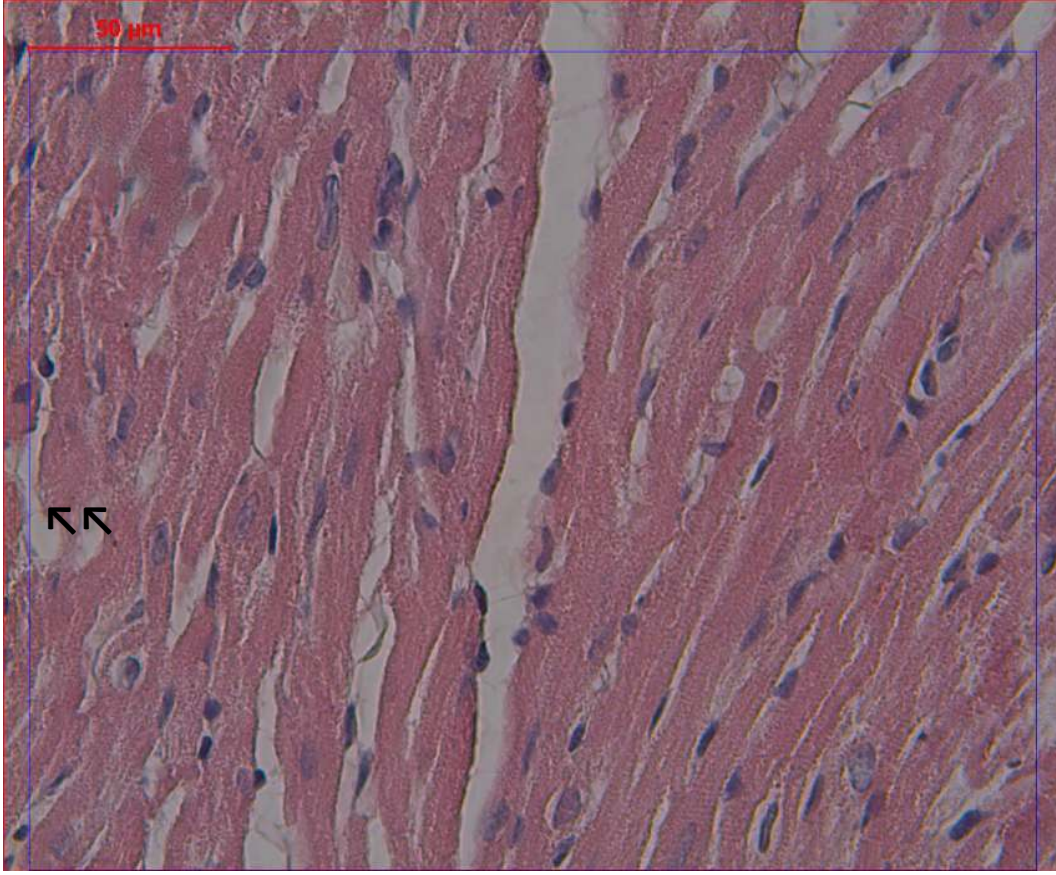
Resim 1: Kontrol (I/R) grubuna ait kalp kası liflerinin (kl) düzenleriminde bozukluk, kalp kası liflerinin enine çizgilenmesinde kayıp, diskus-interkalaris yokluğu, kas liflerinde merkezi yerleşim göstermesi gereken çekirdek (ç) yapılarında yer değişikliği görülmekte. (Hematoksilen – eozin, x40)



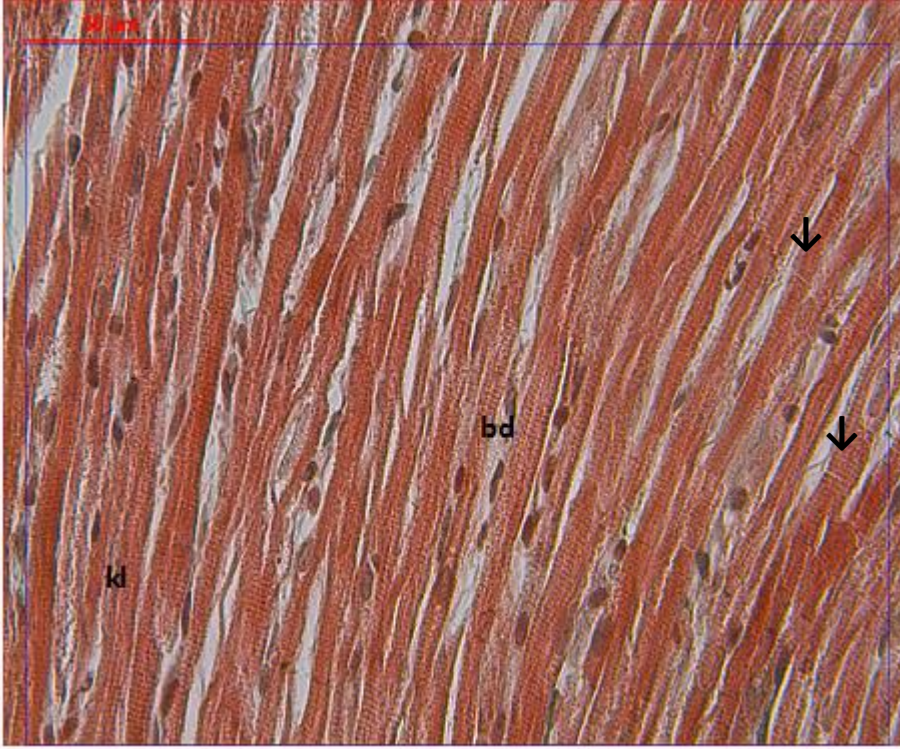
Resim 2: Kontrol (İ/R) grubuna ait diğer bir kalp kası kesitinde, kalp kası liflerindeki (kl) dejeneratif değişiklikler, yanı sıra kalp kası lifleri arasındaki geniş ödematöz alanlar (*) dikkati çekmekte. (Hematoksilen – eozin, x40)



Resim 3: Kontrol (İ/R) grubunun Masson-trikrom ile boyanmış kesitinde, H.E ile boyanmış kesit de olduğu gibi kalp kası liflerinde (kl) disorganizasyon, enine çizgilenmede bozulmalar ve diskus-interkalaris kaybı, çekirdek lokalizasyonunda değişiklikler, kas lifleri arası bağ-dokusunda dejenerasyon (*) ve ödematöz alanlar görüldü. (Masson-trikrom, x40)



Resim 4: Hepsidin grubuna ait kesitlerde bazı alanlarda İskemi-reperfüzyon etkisinin hala devam etmekte olduğu (↖↖), ancak genel olarak kontrol grubuna göre kalp kas liflerinin organizasyonunun, hücre çekirdeği yerleşiminin, enine çizgilenmenin kas lifleri arası bağ dokusu yapılanmasının kontrol grubuna göre daha düzenli olduğu görüldü. (H.E, x40)



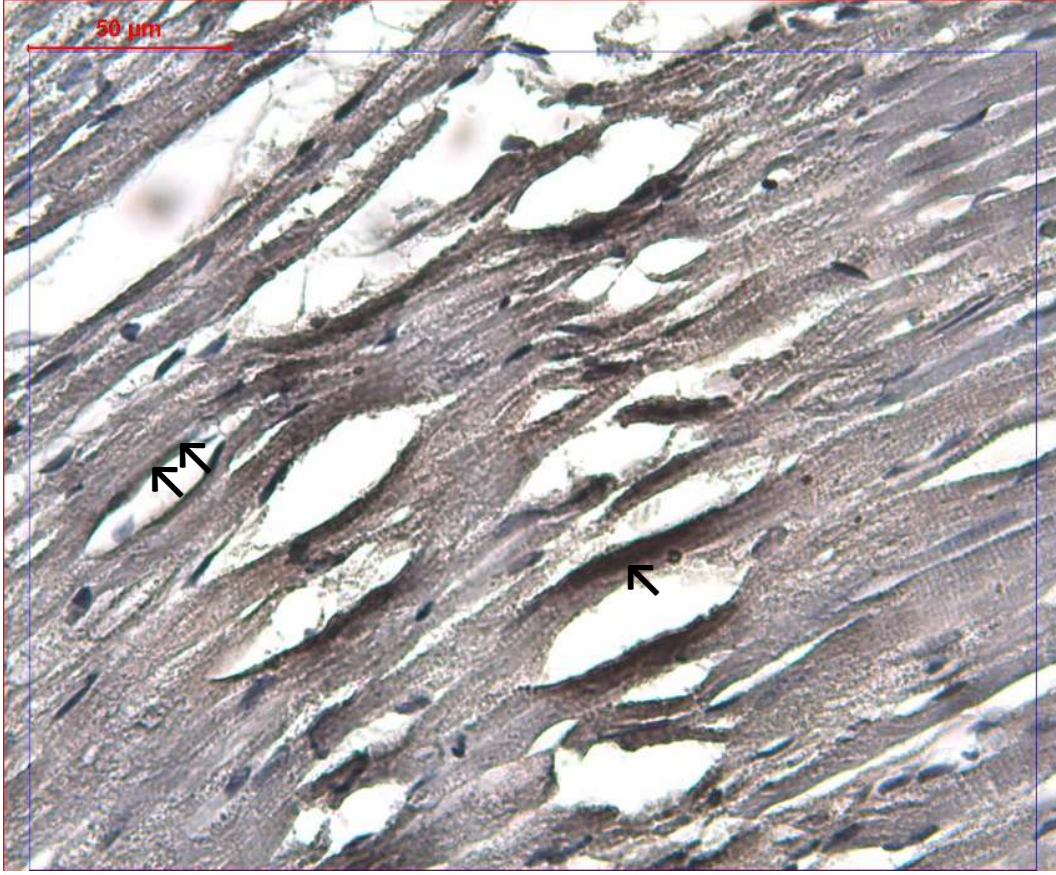
Resim 5: Hepsidin grubunun Masson-trikrom ile boyanmış kesitlerinde, kalp kası lifleri (kl) birbirlerine paralel olarak düzenlenmiş, kalp kası lifleri arası bağ dokusunun (bd) normal yapıda olduğu, kalp kası liflerinde enine çizgilenmenin ve diskus-interkalarislerin görülmeye başladığı dikkati çekti. (↓) (Masson-trikrom, x20)

4.8.İmmunohistokimyasal Bulgular

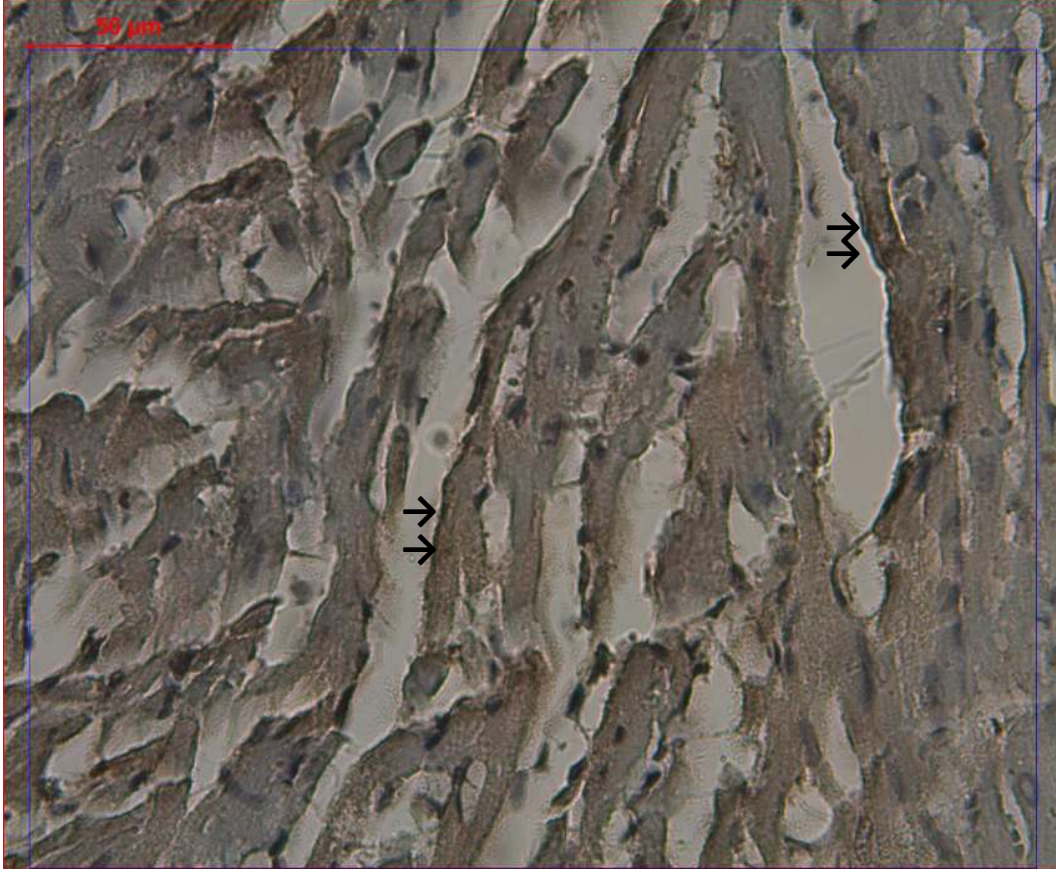
Kontrol (İ/R) grubunun Caspase-9 ile yapılan immunohistokimyasal boyamasında, kas liflerinde sitoplazmik ve sarkolemmada membranöz özellikte immünreaktivite varlığı saptandı (Resim 6,7). Kas liflerinin yanı sıra, kas lifleri arasındaki bağ dokusunda yer alan vasküler oluşumların endotel hücrelerinde de Caspase-9 immünreaktivitesi dikkati çekti. (Resim 8)

Hepsidin grubunun Caspase-9 ile yapılan immunohistokimyasal boyamasında, Kontrol (İ/R) grubunda kas liflerinde sitoplazmik ve membranöz immünreaktivite artışına rastlanmadı. (Resim 9,10).

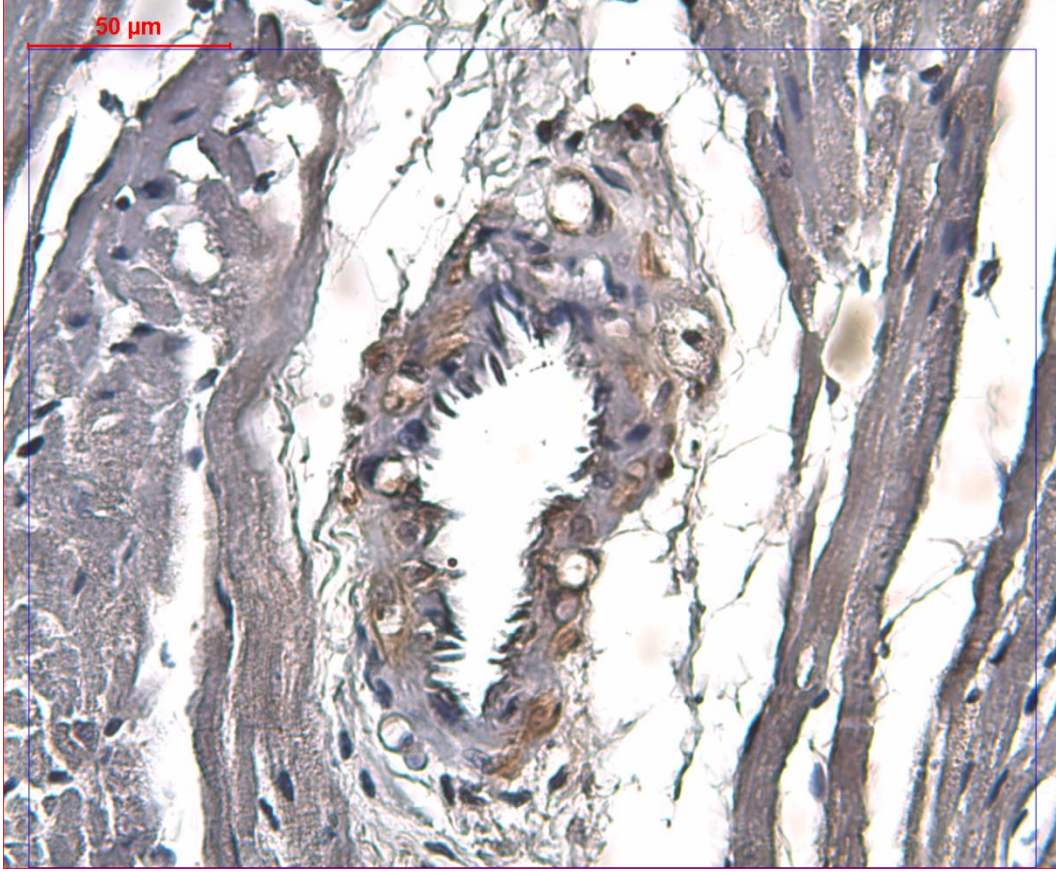
Sonuç olarak, normal ve sağlıklı yapıdaki kalp kası liflerinde görülebilecek fizyolojik apoptozisin kontrol (İ/R) grubunda artmış olduğu gözlemlendi. Buna karşılık, hepsidin uygulanmış grupta, kontrol (İ/R) grubundaki artmış apoptozis bulgularına rastlanmadı.



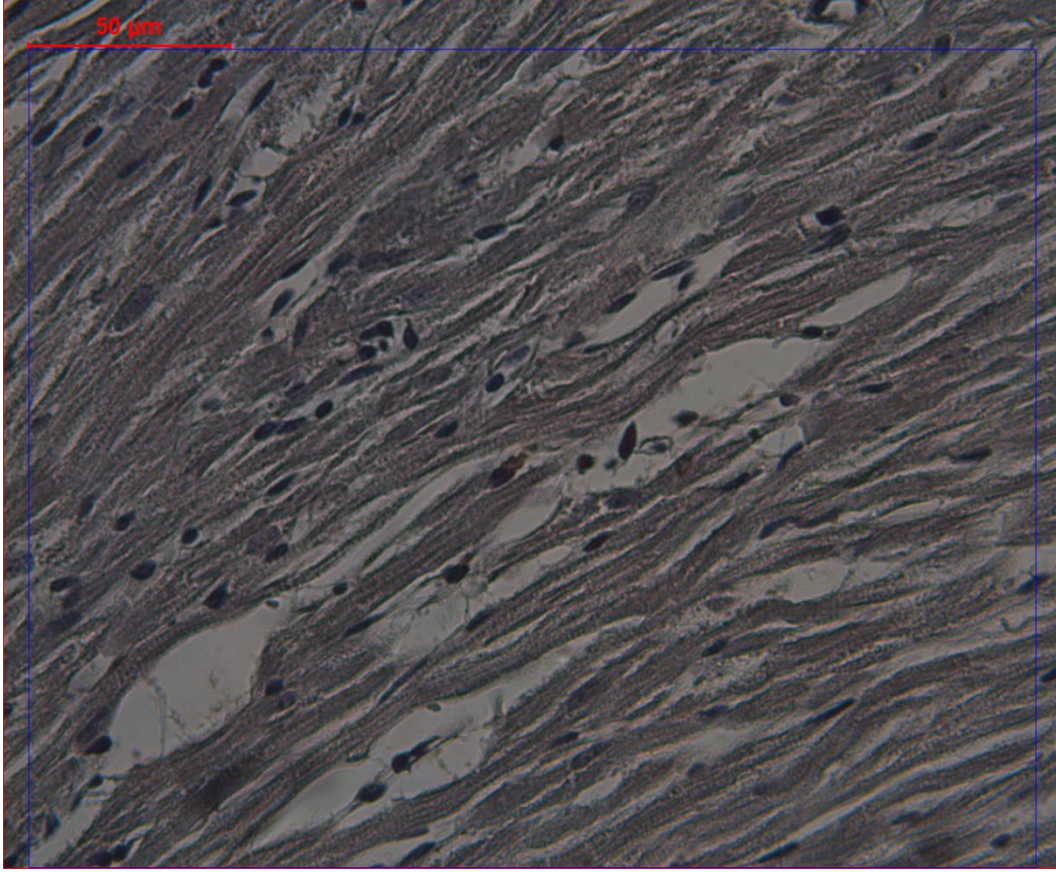
Resim 6: Kontrol (İ/R) grubuna ait kesitte kalp kası liflerinde sitoplazmik (↗) ve membranöz (↗↗) immünreaktivite görülmekte. (Caspase-9x10)



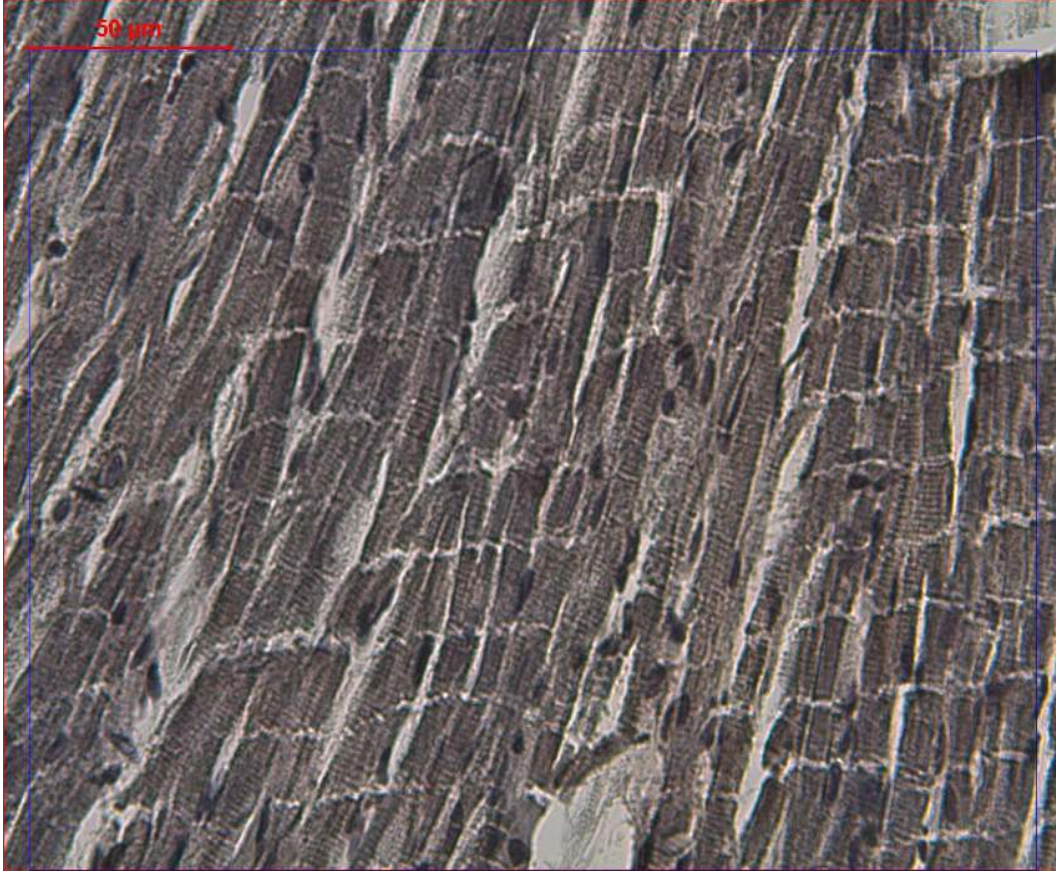
Resim 7: Kontrol (İ/R) grubuna ait kesitte ($\rightarrow$) kalp kası liflerinde membranöz immünreaktivite izlenmekte. (Caspase-9,x40)



Resim 8: Kontrol (İ/R) grubuna ait kesitte kas lifleri arası bağ dokudaki vasküler oluşuma ait endotel hücrelerinde immünreaktivite artışı görülmekte. (Caspase-9x40)



**Resim 9: Hepsidein grubuna ait kesitlerde kas liflerinde immünreaktivite artışı saptanmadı.
(Caspase-9x40)**



**Resim 10: Hepsidin grubuna ait kesitlerde kas liflerinde immünreaktivite artışı saptanmadı.
(Caspase-9x40)**

5.TARTIŞMA

Hepsidin, son yıllarda önemi giderek artan bir hormondur.⁸¹ Demir metabolizmasına etkisi, çeşitli dokularda bulunuşu, hipoksi ve anemide azalması nedeni ile hepsidinin etkilerini incelemek amacı ile iskemik bırakılan (akımsız) kalp dokusuna hepsidin uygulandı.

Son kanıtlar, demir metabolizmasının miyokard enfarktüsü sonrası iskemik hasarda rol oynadığını düşündürmektedir. Miyokard enfarktüsünden altı saat sonra iskemik ve iskemik olmayan miyokard hücrelerinde hepsidin mRNA ekspresyonu geçici olarak artmış bulunmuştur. Artış spesifik olarak hepsidin için olmakta, diğer demir-ilişkili genlerde (hemojuvelin, IREG-1) değişiklik gözlenmemiştir. Enfarkte sıçanların iskemik alanda hepsidin protein ekspresyonunun değişmesi serum hepsidin seviyesi ile bağlantılıdır. Bu veriler göstermiştir ki miyokard enfarktüsünden sonra iskemik ve iskemik olmayan miyokard hücrelerinde hepsidin belirgin bir şekilde artmaktadır. Buda hepsidin upregülasyonunun enfarkte kalpteki demir toksisitesini azaltarak enfarkt alanının genişlemesini azalttığına işaret etmektedir.⁸²

Bir başka çalışmada Deneysel Otoimmün Miyokardit (EAM) ve Akut Miyokard Enfarktüsü (AME) geçiren sıçan kalplerinde, hepsidin kardiyomiyositlerde eksprese edilmiştir; aynı zamanda hücrede demir deposu olan ve hepsidine bağlanan ferroportin de çeşitli hücreler de eksprese olmuştur. EAM ve AME geçiren kalplerde hepsidin eksprese oranı interleukin-6/gamma-actin ile anlamlı olarak artış göstermiştir. Aynı oran histolojik olarak miyokardit geçiren insan kalplerinde, miyokardit olmayanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kardiyomiyositlerde miyokardit ve miyokard enfarktüsü altında Hepsidin yapımı uyarılır. İnflamatuvar sitokin düzeylerinin artması ise, demir homeostazısı ve serbest radikal oluşumunda önemli bir rol oynar.⁸³ Bu veriler ışığında çalışmamızda İ/R

sırasında ve sonrasında kalp dokusu oksidan ve antioksidan sistem göstergeleri olan NOx, MDA ve GSH oluşumunu inceledik.

Kalp İ/R'nunda dışarıdan verilen NO oksidan hasarı artırıcı, antioksidan mekanizmaları azaltıcı yönde etkide bulunmuştur.⁶⁶

İskemi, damar endotelinde hem inflamatuvar hücre infiltrasyonu hem de indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesini artırır. Böylece iskemi sırasında NO seviyesi artarken, reperfüzyon sürecinde kan akımının yeniden başlamasıyla, büyük miktarlarda moleküler oksijen dokulara taşınır. Reperfüzyon hasarından sorumlu olduğu düşünülen çok miktarda serbest oksijen radikali ve süperoksit $O_2^{\cdot-}$ ortaya çıkar.^{84,85}

İskemi sırasında oluşan aşırı miktardaki NO, ya bu radikalin stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrata dönüşür ya da $O_2^{\cdot-}$ radikali ile reaksiyona girerek bir toksik oksijen metaboliti olan peroksinitrit ($ONOO^-$) 'i oluşturur. Peroksinitrit ($ONOO^-$) ise dokularda hasar yapar.⁸⁶

Reperfüzyon sırasında hem süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hem de NO üretimi söz konusu olup bu iki molekül $ONOO^-$ oluşturmaz. Böylece NO'nin fizyolojik etkisi inhibe edilirken, oksidatif stres artar. Wang ve ark. NO'nin kalpteki toksik etkisini; süperoksit ile reaksiyonu sonucu oluşan $ONOO^-$ 'e bağlamışlardır.⁸⁷

$ONOO^-$ 'in NO benzeri aktivitesi çok düşüktür, ancak güçlü bir oksidandır ve biyolojik sistemlerde ve membranlarda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu reaksiyonlarına neden olur.⁸⁷

Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve $ONOO^-$ 'in reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazla olduğu gösterilmiştir. NO düzeyindeki bu gecikmiş artış, doku hasarının daha da artmasına neden olur.⁷⁰

Yapılan birçok araştırmada, iskemi reperfüzyona bağlı olarak yüksek miktarda meydana gelen NO ve ONOO- oluşumu azaltılarak hasarın önlenileceği ileri sürülmüştür.⁸⁸

Çalışmamızda doku NOx düzeyleri, hepsidin verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur, bu durum hepsidinin İ/R sırasında koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Hepsidin kalp de salınabilen kalbe de ait bir hormondur. Salınımı hipoksi ve inflamasyon ile düzenlenir. Doku hipoksisi ile hepsidin üretiminin indüklenmesi, artmış ferritin ve azalmış serbest O₂ radikalleri ile kalpte koruyucu bir görev üstlenmekte olduğunu göstermektedir.¹⁰

Doku MDA düzeyleri ele alındığında hepsidin'in iskemi-reperfüzyon da oksidan stresi azalttığı gözlenmiştir. Doku GSH düzeyi hepsidin grubunda azalmakla birlikte anlamlı değildir. Bu durum Uta Merle ve arkadaşlarının bulgularını destekler nitelikte olup hepsidin'in İ/R sırasında koruyucu etkisinin bulunduğunu ve oksidatif hasarı önlediğini göstermektedir.¹⁰

Buna benzer etki kalpten çıkan sıvıdaki iyon miktarlarında da gözlemlendi. Hepsidin grubunda iyon çıkışlarının daha düzgün ve preiskemiye yakın miktarlarda olduğu izlendi. Bu durum hücrelerin daha az hasar görmesi ile açıklanabilir.

İskemi, miyokard hücrelerinde Ca²⁺ düzeylerinde dengenin bozulmasına neden olur. Bu hasar sonucunda hücre dışından ve hücre içi depolarından kaynaklanan artmış Ca²⁺ düzeyleri, reperfüzyon döneminde toksik düzeylere çıkabilir. Sitoplazmik Ca²⁺ düzeylerinin aşırı yüksekliği miyofibrillerin duyarlılığını azaltarak kontraktür gelişimine yol açabilir.^{89,90,91}

Çalışmamız da kalsiyum düzeyleri 30. dakikada hepsidin verilen grupta kontrol (İ/R) grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu bulgu daha az hücre hasarın birikimi ile açıklanabilir.

İskemi hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak hücre içi adenozin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezinde azalmaya yol açar. Bu durum hücre membranının ATP' ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu bozarak hücreye daha fazla kalsiyum, sodyum ve su girmesi ile sonuçlanmaktadır.⁹²

Na-K ATPaz hücre membranında sodyum ve potasyum gradientini sağlayarak anahtar rol oynayan önemli bir membran enzimidir. Benkoel ve ark. karaciğer iskemi reperfüzyonuyla Na-K ATPaz aktivitesinde düşme olduğunu bildirmişlerdir.⁹³ Y. Samet'in çalışmasında da Na-K ATPaz aktivitesi İ/R grubunda belirgin olarak düşüş göstermiştir.⁹⁴ Buda hücre içi Na ve hücre dışı K artışına neden olur.

Çalışmamızda 30. dakikada aldığımız perfüzyat sıvısının analizi sonucunda Hepsidin grubunun kontrol grubuna göre anlamlı olmamakla birlikte Na miktarında artış, K miktarında düşüş izlendi. Bu durum Na-K ATPaz aktivitesinin Hepsidin verilen örneklerde normale yakın olduğunu ve Hepsidinin koruyucu bir etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan potasyum ve magnezyum iyonlarının konsantrasyonları değişir ve buna bağlı olarak protein sentezinde inhibisyon gerçekleşir.⁹⁵ Hepsidin grubundan alınan sıvıda Magnezyum miktarı 30. dakikada Kontrol (İ/R) grubuna göre anlamlı olmamakla birlikte daha düşük bulundu ve Hepsidin'in koruyucu etkisini gösterdi.

Talyum, Potasyum analogu gibi davranan, ATP bağımlı Na-K kanallarından aktif olarak hücre içine alınan ve miyokard perfüzyon sintigrafisi için en sık kullanılan radyofarmasötik radyoaktif bir ajandır. İntravenöz enjeksiyon sonrası Talyum hızla hücre içine alınır. Hücre içine alınımın %60'ı Na/K ATPaz sarkolemmal

membran transport pompasıyla olur. Aynı zamanda enerji bağımlı olmayan difüzyon ile de hücreye alımı mevcuttur. Na/K ATPaz sistemini bloke eden ouabain ve dijitaler talyumun hücre içine alınımını bloke eder.^{96,97,98}

Hepsidin grubundan alınan perfüzet örneklerinde Talyum miktarı 30 dakikada kontrol grubuna göre anlamlı olmamakla birlikte daha düşük bulundu ve Hepsidin'in koruyucu etkisini düşündürdü.

Perfüzet viskozite değerlerinde gerek grup içi gerekse gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte daha düzgün değerlerin elde edilmiş olması Hepsidin'in koruyucu etkisi ile açıklanabilir. Viskoziteyi en önemli etkileyen faktörün protein olabileceği düşünüldüğünde 30 dakikalık reperfüzyon süresinin protein çıkışına neden olmadığını düşündürmektedir.⁹⁹

Hepsidinin kalpte koruyucu bir görevinin olduğu histolojik bulgularımızda da izlendi. Hepsidin uygulanan grupta, belli alanlarda İskemi-reperfüzyon etkisinin devam ettiği ve İskemi-reperfüzyon (kontrol) grubu ile benzer görünümde olduğu, belli alanlarda ise normal kalp kası yapısına benzerlik gösteren doku özelliğinde olduğu gözlemlendi.

Benzer etki immunohitokimyasal bulgularda da tespit edildi. Kontrol (İ/R) grubunda kalp kası liflerinde mevcut olan fizyolojik apoptozisin arttığı, hepsidin verilen grupta ise kontrol grubunda artmış olan apoptozisin görülmediği izlendi.

Yong Ma ve Youjia Xu, osteoblast kültürlerinde 200 nmol/L uygulanan hepsidin'in apoptozisi %7.32 den %2.46 ya düşürdüğünü gözlemişlerdir.¹⁰⁰ Bu sonuçlar bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Histolojik ve immunohitokimyasal sonuçlarımıza dayanarak ve biyokimyasal bulguların ışığı altında 10^{-5} M konsantrasyonda iskemi başlangıcında uygulanan hepsidin'in kalp üzerinde koruyucu bir etkide olduğu tesbit edilmiştir.

Çalışmanın İn vivo olarak yapılması, hepsidin'in koruyucu etkisi için daha yol gösterici olacaktır.



6.SONUÇ

Bu çalışmada hepsidin'in kalp iskemi-reperfüzyon üzerine etkileri araştırıldı. Hepsidin, iskemi başlangıcında verildi. Hepsidin verilen grupta kalp dokusunda NOx ve MDA düzeylerinde anlamlı düşüş ve GSH düzeyinde anlamlı olmayan bir düşüş bulundu. Perfüzat NOx düzeylerinde grup içi ve gruplar arası fark bulunamamıştır. iskemi öncesi ve reperfüzyonun 1, 5,10, 20, 30. dakikalarında kontrol ve hepsidin grubuna ait toplanan perfüzatların viskozite değerlerinde grup içi ve gruplar arası fark bulunamamıştır. Perfüzat iyon miktarı, iskemi öncesi ve reperfüzyonun 1, 5,10, 20, 30. Dakikalarında demir, kalsiyum, magnezyum, potasyum, sodyum ve talyum da kontrol (İ/R) grubuna göre hepsidin grubunda daha düzgün iyon değerleri izlendi. Histolojik değerlendirmelerde kalp kası liflerinin organizasyonu, kas liflerindeki enine çizgilenme, diskus interkalarisler, kalp kası liflerine ait çekirdeklerin yerleşimi ve kalp kası lifleri arası bağ dokusunun görünümü hepsidin uygulanan grupta normale daha yakın izlendi. İmmunohistokimyasal değerlendirmelerde hepsidin uygulanmış grupta, kontrol (İ/R) grubundaki artmış apoptozis bulgularına rastlanmadı.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgular ışığında kalp iskemi reperfüzyonunda uygulanan hepsidin kalp üzerinde koruyucu bir etkide bulunmuştur.

7.ÖZET

Hepsidin, demir metabolizmasının düzenlenmesindeki temel hormondur. Hepsidin kalpten de salınabilen intrensek kardiyak bir hormondur, salınımı hipoksi ve inflamasyon ile düzenlenir. Çalışmamızda hepsidinin kalp iskemi-reperfüzyon hasarına olan etkilerini araştırmayı amaçladık. Langendorff sistemi ile perfüze sıçan kalpleri 30'ar dk. stabilizasyon, global iskemi ve takiben reperfüzyona tabii tutuldu. Gruplara iskemi başlangıcında 10^{-5} M konsantrasyonda hepsidin verildi. Tüm bulgulara kontrol(İ/R) grubu hepsidin grubu ile karşılaştırıldı. Kalp dokusunda da MDA, GSH ve NOx düzeyleri ölçüldü. İskemi öncesi ve reperfüzyonun 1, 5, 10, 20, 30. dk.'larında toplanan perfüzetlerde NOx düzeyleri, viskozite ve iyon miktarı ölçüldü. Son olarak da histolojik değerlendirme ve immunohistokimyasal inceleme yapıldı. Hepsidin verilen grupta kalp dokusunda NOx ve MDA düzeylerinde anlamlı düşüş ve GSH düzeyinde anlamlı olmayan bir düşüş oldu. Perfüzatta NOx düzeylerinde ve viskozite değerlerinde grup içi ve gruplar arası fark bulunamamıştır. Perfüzet iyon analizi yapıldığında; demir, kalsiyum, magnezyum, potasyum, sodyum ve talyum da kontrol (İ/R) grubuna göre hepsidin grubunda daha düzgün iyon değerleri izlendi. Histolojik değerlendirmede kalp kası hücre içi ve hücreler arası yapılarda hepsidin grubunda normale daha yakın bir izlenim oldu. İmmunohistokimyasal bulgulara hepsidin uygulanmış grupta, kontrol (İ/R) grubundaki artmış apoptozis bulgularına rastlanmadı. Histolojik ve immunohitokimyasal sonuçlarımıza dayanarak ve biyokimyasal bulguların ışığı altında 10^{-5} M konsantrasyonda iskemi başlangıcında uygulanan hepsidinin kalp üzerinde koruyucu bir etkide olduğu tesbit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hepsidin , kalp iskemi reperfüzyon , oksidan stres.

8.SUMMARY

Hepcidin is the main hormone in the regulation of iron metabolism. Also hepcidin is a intrinsic cardiac hormone that released from the heart and its secretion is regulated by hypoxia and inflammation. In our study, we aimed to investigate the effects of hepcidin on the cardiac ischemia-reperfusion injury. Perfused rat hearts with Langendorff system were subjected for 30 min to stabilization, global ischemia followed by reperfusion. Given 10^{-5} M concentration of hepcidin to groups at the origin of ischemia. In all findings, control (I/R) groups compared with hepcidin groups. In heart tissue MDA, GSH and NOx levels were measured. Measured NOx levels, viscosity and ion content for the perfusate that collected before ischemia and in 1, 5, 10, 20, 30, minutes of reperfusion. Finally, the histological and immunohistochemical examinations were performed. Hepcidin levels in the groups with significant decrease in heart tissue NOx and MDA but GSH level was non-significant decrease. It was not found difference in perfusate levels of NOx and viscosity values of the intra-groups and inter-groups. Perfusate ion analysis was done; iron, calcium, magnesium, potassium, sodium, thallium in the hepcidin groups showed more regular ion values than control (I/R) groups. Histological examination showed heart muscle intracellular and intercellular structures in hepcidin groups closer to normal. Immunohistochemical findings in the hepcidin treated groups showed no evidence of increased apoptosis like that is found in control (I/R) groups. Based on histological and immunohistochemical results and in the light of our biochemical findings with given 10^{-5} M concentration of hepcidin at the beginning of ischemia has been found to be a protective effect on the heart.

Key words: Hepcidin , cardiac ischemia reperfusion , oxidant stress.

9.KAYNAKLAR

- 1- Ganz T. Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2005; 18 (2): 171-82.
- 2- Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Hepcidin-- central regulator of iron metabolism. *European Journal of Haematology* 2007; 78: 1-10.
- 3- Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals* 2007; 20: 665-74.
- 4- Ganz T. Hepcidin and Its Role in Regulating Systemic Iron Metabolism. *Hematology* 2006; 29-35.
- 5- Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of Iron Homeostasis. *New England Journal of Medicine* 2005; 352(17): 1741-4.
- 6- Loncar R, Flesche CW, Deussen A. Myocardial ferritin content is closely related to the degree of ischaemia. 2004 *Acta Physiol Scand* 180:21–28.

- 7- Voogd A, Sluiter W, van Eijk HG, Koster JF. Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. 1992 J Clin Invest 90:2050–2055.
- 8- Muñoz Gómez M, Campos Garríguez A, García Erce JA, Ramírez Ramírez G. Physiopathology of iron metabolism: diagnostic and therapeutic implications. Nefrologia 2005; 25: 9-19.
- 9- Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. 2002 Blood 99:3505–3516.
- 10- Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. Endocrinology. 2007 Jun;148(6):2663-8.
- 11- Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Letters 2000; 480: 147-50.
- 12- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. The Journal of Biological Chemistry 2001; 276(11): 7806-10.
- 13- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 knockout mice. Proc Natl Acad Sci. 2001;98:8780–8785.

14- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new Mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 7811-7819.

15- Vyoral D, Petrak J. Hepcidin: A direct link between iron metabolism and immunity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005;37:1768–73.

16- Hunter HN, Fulton DB, Ganz T. The Solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(40):37597-603.

17- Basol G, Barutçuoğlu B, Bozdemir AE. Demir homeostazının yeni düzenleyicisi Hepsidin. *Türk klinik biyokimya dergisi*. 2007;5(3):117-125.

18- Kaplan M, Solmazgöl E, Nalbant S. Kronik hastalık anemisi ve Hepsidin. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2006;26:538-544.

19- Lou DQ, Nicolas G, Lesbordes JC, et al. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. 2004;103:2816-21.

20- Wallace DF, Jones MD, Pedersen P, Rivas L, Sly LI, Subramaniam VN. Purification and partial characterisation of recombinant human hepcidin. *Biochimie*. 2006;88(1):31-7.

21- Ganz T. Hpcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemi of inflammation. Blood 2003;102:783-88.

22- Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. Blood. 2006;107(1):328-33. PMCID: 1895343.

23- Farnaud S, Patel A, Evans RW. Modelling of a metal-containing hepcidin. Biometals. 2006;19(5):527-33.

24- Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. Clin Chem. 2007;53(4):620-8.

25- Kulaksız H, Gehrke SG, Janetzko A, et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. Gut. 2004;53:735-43.

26- Simavlı S. Maternal Serum Hepsidin Düzeylerinin Erken Doğum Ve Diğer Kötü Gebelik Sonuçlarını Öngörmedeki Rolü. Uzmanlık Tezi. Ankara: Fatih Üniversitesi; 2011.

27- Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson RS, Nizet V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*. 2006;107(9):3727-32. PMID: 1895778.

28- Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006;131(3):788-96.

29- Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*. 2004;53:735–743.

30- Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol*. 2005;184:361–370.

31- Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr* 2006; 26:323–42.

32- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002;110(7):1037-44. PMID: 151151.

33- Fleming RE, Sly WS. Heparin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad. Sci.* 2001;98:8160–8162.

34- Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest.* 2007;117(7):1926-32. PMID: 1884690.

35- Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C. Heparin a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29:327–335.

36- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone heparin. *J Clin Invest.* 2004;113(9):1271-6. PMID: 398432.

37- Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of heparin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood.* 2005;106(5):1864-6.

38- Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101(7):2461-3.

39- Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E. The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(25):9263-5. PMID: 438964.

40- Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*. 2006;108(9):3204-9. PMID: 1895528.

41- Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(6):1906-10. PMID: 548537.

42- Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006;108(12):3730-5. PMID: 1895477.

43- Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*. 2007;13(9):1096-101.

44- Njajou OT, de Jong G, Berghuis B, Vaessen N, Snijders PJ, Goossens JP, et al. Dominant hemochromatosis due to N144H mutation of SLC11A3: clinical and biological characteristics. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(3):439-43.

45- Laftah AH, Ramesh B, Simpson RJ, Solanky N, Bahram S. Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood*. 2004;103:3940–3944.

46- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.

47- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005;1(3):191-200.

48- De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell*. 2007;18(7):2569-78. PMID: 1924807.

49- Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, et al. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood*. 2009;113(24):6225-36.

50- Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-70 containing organs. *Blood*. 2005;106(6):2196-9. PMID: 1895137.

51- Tiryaki Ö. Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi Yapan Hastalarda Eritropoietin Tedavisine Cevap Azlığında Hepsidinin Rolü. Yan Dal Uzmanlık Tezi. Gaziantep. Gaziantep Üniversitesi; 2010.

52- Teagtmeyer H, King LM, Jones BE. Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets of pharmacotherapy. Am J Cardiol 1998;82:54-60.

53- Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. Pharmacol Ther 89: 29–46, 2001.

54- Suleiman MS, Zacharowski K, Angelini GD. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. British Journal of Pharmacology 2008;153:21-33.

55- Damjanov İ, Linder J, Cell injury and cellular adaptations. Anderson's Pathology. Tenth Edition. Volum 1;p.357-65.

56- Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. Ann Thorac Surg 1999;68:1905-2012.

57- Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol 2002;282(2):227-41.

58- Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol* 1997;58:95-117.

59- Miki S, Ashraf M, Salka S, Sperelakis N. Myocardial dysfunction and ultrastructural alteration mediated by oxygen metabolites. *J Mol Cell Cardiol* 1988;20:1009-24.

60- Tyagi P, Tayal G. Ischemic preconditioning of myocardium. *Acta Pharmacol Sin* 2002 Oct;23(10):865-870.

61- Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int.* (1991). 39: 476.

62- Banos G, Elhafidi M, Franco M. (2000). Oxidative stress and cardiovascular physiopathology. *Curr Topics Pharmacol.* 5: 1–17.

63- Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI. (1998). Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc West Pharmacol Soc.* 41: 229-36.

64- Lucchesi BR. Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol.* (1990). 52: 61-576.

65- Ceconi C, Bernocchi P, Boraso A, Cargnoni A, Pepi P, Curello S, Ferrari R. New insights on myocardial pyridine nucleotides and thiol redox state in ischemia and reperfusion damage. *Cardiovasc Res.* (2000). 47: 586-94.

66- Ünal M. Endotelin-1 ve Nitrik Oksit İnhibisyonunun Kalp İskemi Reperfüzyonuna Etkileri. Doktora Tezi. Ankara. Gazi Üniversitesi.2007.

67- Ozkan M, Yuksekol I. Nitrik Oksit ve akciğerler. *Toraks dergisi* [serial online] Nisan 2003 [cited April 2003] 4 (1) [1 screens] Available from: URL : <http://www.toraks.org.tr/journal/text.php3id=312>.

68- Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. (1992). Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin.* 90: 1116–21.

69- Wang Q-D, Pernow J, Sjöquist P-O, Ryden L. (2002). Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research.* 55:25-37.

70- Wildhirt SM, Weismueller S, Schulze C, Conrad N. (1999). Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia / reperfusion contributes to disorders to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 43: 698–711.

71- Arıncı Kaplan, Elhan Alaittin. Anatomi. 2. Cilt. 1997: 3-11.

72- Snell RS. Clinical anatomy for medical students. Fifth edition. 1995: 96-98.

73- Yıldırım Mehmet. İnsan Anatomisi, İstanbul, Beta Basım Yayım Dağıtım, 1994: 97.

74- Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce yapı ve Gelişme. Antıp A.Ş yayınları 2002: 24-26.

75- Sağlam M. Genel histoloji. Genişletilmiş 4. Baskı. 1993: 243-246.

76- Birincioğlu M. İskemi-reperfüzyon aritmilerine ACE inhibitörleri, Glutation ve indometazinin etkileri. Uzmanlık Tezi. 1996.

77- Süzer Ö. Langendorff İzole Perfüze Kalp Preparatı ve Kullandığımız Çalışma Modelleri. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Seminerleri Programı, Prof. Dr. Reşat Garan Toplantısı. 3-5 Mart 1997, Uludağ. Türk Farmakoloji Derneği Yayınları No 14, Ankara, 1997 sayfa 40-47.

78- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *NitricOxide*. 2001 Feb;5(1):62-71.

79- Casini A, Ferrali M, Pompelam A, Maellaro A, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol*. 1986;123:520-531.

80- Aykac G, Uysal M, Yalcin AS, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 1985;36:71-76.

81- Başol G, Barutçuoğlu B, Bozdemir AE. Hepcidin, A New Regulator of Iron Homeostasis. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 2007; 5(3): 117-125.

82- Simonis G, Mueller K, Schwarz P, Wiedemann S, Adler G, Strasser R, Kulaksiz H. The iron-regulatory peptide hepcidin is upregulated in the ischemic and in the remote myocardium after myocardial infarction. *Peptides*. 2010; 9:1786-1790.

83- Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Hao K, Ding L, Tanaka K, Takayama T, Kato K, Okura Y, Kodama M, Ota Y, Hayashi J, Aizawa Y. Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010; 8: 749-756.

84- Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol.* 2000;138(4):532-543.

85- Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc Res.* 1999;44(1):47-59.

86- Beckman JS. -OONO: rebounding from nitric oxide. *Circ Res.* 2001 Aug 17;89(4):295-297.

87- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991 Aug 1;288(2):481-7.

88- James JP, Benedict RL. Mechanism of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1905- 1912.

89- Gross GJ, Kersten JR, Warltier DC. Mechanisms of postischemic contractile dysfunction. *Ann Thorac Surg*, 1999; 68: 1898- 1904.

90- Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusioninjury, a clinical view on a complex pathophysiological process. Int J Cardiol, 2005 Apr 20;100:179-190.

91- Piper HM, Meuter K, MD, Schafer C. Cellular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury. Ann Thorac Surg, 2003; 75: 644-648.

92- Kandilci HB, Gümüşel B. Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2005 Ocak;1:35-49.

93- Benkoel L, Dodero F, Hardwigsen J, Mas E, Benoliel AM, Botta-Fridlund D, Le Treut YP, Chamlian A, Lombardo D. Effect of ischemia-reperfusion on Na⁺, K⁺-ATPase expression in human liver tissue allograft: image analysis by confocal laser scanning microscopy. Dig Dis Sci. 2004 Sep;49(9):1387-93.

94- Yardımcı S. Kısa Dönem Montelukast Tedavisinin Deneysel Olarak Oluşturulmuş Hepatik İskemi Reperfüzyon Modeline Etkileri. Uzmanlık Tezi. İstanbul. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 2009.

95- White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theroretical perspective on membrane damage and repair. Neurology, 1993; 43: 1656-1665.

96- Thrall JH, Ziessman HA (eds). Cardiovascular system. In: Nuclear Medicine the Requisites. St. Louis: Mosby, 55-91.

97- Atkins, HL, Budinger TF, Lebowitz E. Thallium-201 for medical use-Part 3: human distribution and physical imaging properties. J Nucl Med 1977; 18:133-40.

98- McKillop JH. Thallium 201 scintigraphy. West J Med 1980; 133:26-43.

99- Lowe, G.D.O., Pearson, T.C., Stuart, J., Thomas, D.J., Walker, C.H.M. Clinical Blood Rheology, Volume I, CRC Press, Boca Raton-Florida, 1-85, 1998.

100- Ma Y, Xu Y. Effect of hepcidin on proliferation, apoptosis, mineralization and gene expression of osteoblast (hFOB1.19) in vitro. Bone, 2010; 47: S407.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Atilla
Soyadı	BAYRAKTAR
Doğum Yeri ve Tarihi	Kerkük 24/09/1979
Eğitimi	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AbD Doktora Öğrencisi Bağdat Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi 2002
Yabancı Dili	Arapça / İngilizce

