



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DEMİR YÜKLENMESİNİN
HEMATOPOİETİK SİSTEM, KEMİK İLİĞİ
VE İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Esin GÜLEN

Antalya, 2012



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

RATLARDA DEMİR YÜKLENMESİNİN HEMATOPOİETİK SİSTEM, KEMİK İLİĞİ VE İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Esin GÜLEN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşen TİMURAĞAOĞLU

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2012

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2011.04.0103.008 Proje No ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesindeki İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca asistanlığını yapma fırsatı bulduğum ve her konuda desteğini bizden esirgemeyen değerli hocam ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ender TERZİOĞLU'na; tez projesinin planlanması ve hazırlanması sırasında ayrıca asistanlık eğitimim boyunca kazandığım deneyim ve kendimi geliştirmemde büyük emeği olan tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşen TİMURAĞAOĞLU'na ve tüm İç Hastalıkları öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık tez çalışmalarım sırasında tez projesinin planlanması, yapılışı, tez verilerinin toplanması ve yorumlanması, istatistik çalışmalarının yapılması ve tezin yazımı sırasında sabırla ve fedakarlıkla her daim bana yardımcı olan ve sürekli desteğini hissettiğim Sayın Yrd.Doç.Dr. Aslı TOYLU'ya; flow sitometri verilerinin yorumlanmasına yardımcı olan Sayın Melike ULUBAŞI'ye ve özel hematoloji laboratuvarı çalışanlarına; ayrıca tezin yapılışı sırasında yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına ve uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Doktorluk mesleğinin bilgi dışındaki gerekleri olan insan sevgisi, saygı, vicdan ve merhamet gibi kavramları kendilerinden öğrendiğim, beni koşulsuz sevgi ve özveri ile yetiştiren ve hayatımın her aşamasında sürekli destekleyen annem Zeynep GÜLEN ve babam Ahmet GÜLEN'e tüm destekleri ve varlıkları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Tablolar Dizini	vi
Şekiller Dizini	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Vücutta Demir Dağılımı	2
2.2. Demir Emilimi ve Transferi	3
2.3. Karaciğerde Hematopoietik Süreçte Rol Alan Demir İlişkili Proteinler	4
2.3.1. Transferin	4
2.3.2. HFE	5
2.3.3. Hepsidin	6
2.3.4. Hemojuvelin	8
2.4. Kemik İliğinde Hematopoietik Süreçte Rol Alan Demir İlişkili Proteinler	9
2.5. Demir Yüklenmesine Neden Olan Klinik Durumlar	12
3. MATERYAL VE METOD	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Deney hayvanları	14
3.2. Metod	14
3.2.1. Deney gruplarının oluşturulması ve deneyin yapılması	14
3.2.2. Doku örneklerinin alınması ve örneklerin homojenizasyonu	14
3.2.3. Örneklerin deney için hazırlanması	15
3.2.4. Gen ekspresyonu analizleri	15
3.2.5. ELISA analizleri	15
3.2.6. Flow sitometri analizleri	16
3.3. İstatistiksel Analiz	16
4. BULGULAR	17
4.1. Demir Uygulamasının Sistemik Dolaşımdaki Demir Ve Eritroid İndeksler Üzerine Etkisi	17
4.2. Kemik İliğindeki Eritroid Hücre Özelliklerinin İncelenmesi	18
4.3. Kemik İliğindeki Hedef Gen mRNA Ekspresyonlarının İncelenmesi	23
4.4. Karaciğer Hedef Gen mRNA ve Protein Ekspresyonlarının İncelenmesi	24

5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇLAR	31
7. ÖZET	33
8. ABSTRACT	35
9. KAYNAKLAR	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BFU-E	Burst forming unit-eritroid
BMP	Bone Morfogenic Protein
cDNA	Complementary DNA
CFU-E	Colony forming unit-eritroid
DMT1	Divalen Metal Transporter 1
EPO	Eritropoetin
Fe+2	Ferröz demir
Fe+3	Ferrik demir
FPN	Ferroportin
FSC	Forward scatter
GDF 15	Growth differentiation factor 15 (Büyüme diferansiyasyon faktör 15)
GIP	Glikofosfotidil İnozitol
HB	Hemoglobin
HCT	Hematokrit
HFE	The Human Leukocyte Antigen HLA-linked iron (Fe) loading gene
HJV	Hemojuvelin
IRP 1	Iron-responsive element binding protein 1
IRP 2	Iron-responsive element binding protein 2
i.p.	İntraperitoneal
KH	Kalitsal Hemokromatoz
MCV	Ortalama eritrosit hacmi
mHJV	Membrana bağlı hemojuvelin
sHJV	Selüler Hemojuvelin
mRNA	Messenger ribonükleik asit
PCR	Polymerase chain reaction

RBC	Red blood cell
RDW	Kırmızı küre dağılım aralığı- red blood cell distribution
RES	Retikuloendotelial Sistem
RNA	Ribonükleik asit
SF	Serum fizyolojik
SMAD	Mediators and regulators of TGF- β signaling
STAT	Sinyal transducer and activator of transkription
TDBK	Total Demir Bağlama Kapasitesi
TGF-B	Transforming growth factor
TfR	Transferrin Reseptör
TMPRSS 6	Transmembrane protease serine
TS	Transferrin Saturasyonu
TWSG-1	Twisted gastrulation protein homolog 1
WBC	Beyaz küre sayısı

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Demir homeostazisinde rol oynayan proteinler	5
4.1.	Kontrol ve deney grubunda hemogram ve biyokimyasal ölçüm sonuçları	18
4.2.	Kontrol ve deney grubunda serum Hepsidin, sHJV ve BMP-6 düzeyleri	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Vücutta demir döngüsü	2
2.2. Vücutta demir dengesi	6
2.3. Demir metabolizmasının hepsidin ile regülasyonu	7
2.4. BMP bağımlı HJV sinyal yolağı ve hepsidin ekspresyonunun MTP-2 tarafından inhibisyonu	9
2.5. Eritroid seri öncüllerinin diferansiasyon sürecindeki değişimleri	11
2.6. Eritroid progenitör hücrelerin morfolojik ve CD71 yüzey ekspresyonu değişiklikleri	12
4.1. Kİ total hücreleri içinde CD71 (+) hücre dağılımı	19
4.2. Eritropoetik hücrelerde CD71 ekspresyonu seviyesine göre dağılım yüzdeleri	19
4.3. CD71(+) ve morfolojisi büyük (FSC yüksek) hücrelerin yüzde dağılımı	20
4.4. Eritropoetik hücrelerin CD71 ekspresyonu düzeyine ve hücrelerin büyüklüğüne göre dağılımları- <u>Kontrol Grubu</u>	21
4.5. Eritropoetik hücrelerin CD71 ekspresyonu düzeyine ve hücrelerin büyüklüğüne göre dağılımları- <u>Deney Grubu</u>	22
4.6. Kİ EpoR ekspresyonu değişimleri	23
4.7. Kİ TfR I ekspresyonu değişimleri	23
4.8. Kİ TfR II ekspresyonu değişimleri	24
4.9. Karaciğerde TfR I/II ekspresyon değişimleri	25
4.10. Karaciğerde EpoR ekspresyon değişimleri	25
4.11. Karaciğerde HFE ve Hepsidin genleri ekspresyon değişimleri	26

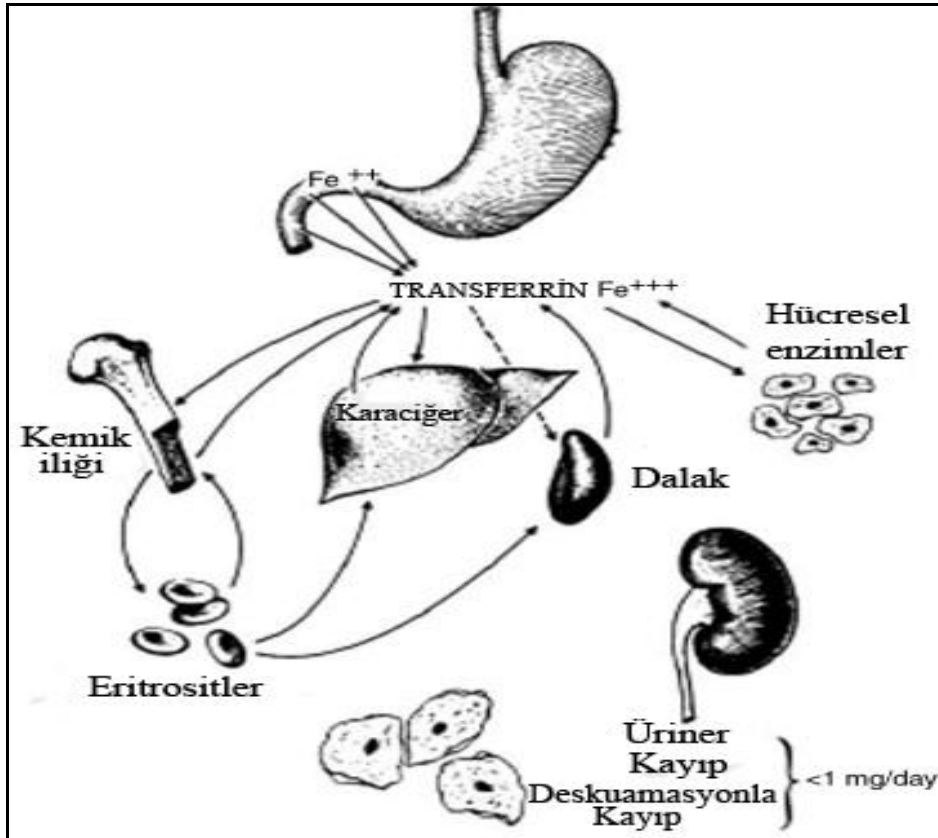
1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kandaki demir miktarı dokulardaki demir ihtiyacı ile ilişkili olarak düzenlenmektedir. Vücutta demirin en yoğun olarak kullanıldığı hücreler eritrositlerdir. Eritrositlerin kemik iliğindeki eritroblastlardan farklılaşması sürecini etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Eritrositlerin farklılaşması sürecinde demirin hücre içine alınmasını ve hemoglobin sentezinde kullanılmasını sağlayan proteinlerin ve bunlarla ilişkili genlerin nasıl düzenlendiklerinin belirlenmesi konusunda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu konuda yürütülmüş çalışmalar çoğunlukla karaciğer dokusu üzerinde yoğunlaşmıştır ancak günümüzde özellikle kalp ve kemik iliğinde demir birikiminin etkileri dikkat çekmeye başlamıştır. Yapılan çalışmalar çoğunlukla inefektif eritropez ortamında araştırılmıştır. Demir yüklenmesinin hematopoetik organlardaki etkileri sistematik olarak tümüyle açıklığa kavuşmamıştır. Projemizde kemik iliği, periferik dolaşım ve karaciğer dokusunda demir metabolizmasında rol alan hedef genlerde demir yüklenmesiyle oluşacak değişimlerin saptanması planlanmaktadır. Elde edilecek verilerin demir birikimi olan hastalıklarda prognoz ve tedaviye yanıtın takip edilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vücutta Demir Dağılımı

Demir, vücudumuz için son derece önemli bir elementtir. Vücuttaki total demir miktarı 70 kg ağırlığındaki insanda yaklaşık 4 gr kadardır (1,2). Hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar ve demiri kofaktör olarak kullanan enzimlerde fonksiyonel şekilde demir bulunmaktadır (3). Fonksiyonel şekilde bulunan demir, vücut total demirinin %70-90'ıdır (1,3,4,). Vücuttaki demirin yaklaşık %70'i hemoglobin içinde bağlı durumda iken, %25'i ferritin ve denatüre olmuş ferritin yapısındaki hemosiderinde, %3-4'ü miyoglobinde, %2'si hücreler arası sıvıda, %0.1'i sitokromlarda, %0.1'i demir-enzim komplekslerinde, %0.1'i plazmada transferrine bağlı olarak bulunur. Karaciğer, dalak, kemik iliği ve kasta ise geri kalan %10-30'luk kısmı ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanır (4). Yaklaşık 3 mg kadar demir ise demir bağlayıcı protein olan transferine bağlı olarak plazmada dolaşır halde bulunur (1).



Şekil 2.1. Vücutta demir döngüsü (“Beutler E, Iron storage disease: facts, fiction and progress. Blood Cells Mol Dis 2007; 39: 140-147” makalesinden modifiye edilerek alınmıştır).

2.2. Demir Emilimi ve Transferi

Normal diyetle günlük 12-18 mg kadar demir alınır. Alınan bu demirin ancak 1-2 mg'ı ince barsaklardan emilir (5). Demir emilimi vücut demir depolarının doymuşluk oranına göre düzenlenir. Vücutta depo demiri azaldığı zaman demir emilimi artar. Eritropoez hızı da demir emiliminin tayininde rol oynar. Eritropoetik aktivite arttığı zaman demir emilimi de artar (1).

Demirin tama yakın kısmı proksimal duodenumdan emilir. Diyetteki inorganik demirin çoğu ferrik (Fe^{+3}) durumdadır ve enterosit tarafından emilebilmesi içi ferröz (Fe^{+2}) duruma indirgenmelidir. Bu indirgeme fırçamsı kenar epitelinde bulunan askorbat bağımlı demir redüktaz enzimi aracılığıyla olur. Oluşan ferröz durumdaki demir divalen katyon taşıyıcı 1 (Divalent metal transporter 1, DMT1) aracılığıyla fırçamsı kenar membrandan hücre içine transfer edilir. Demirin bazolateral enterosit membranından hücre dışına transferi ferroportin proteini ile gerçekleşir (6,7). Ferroportin aracılı demir transportunda Vitamin C'nin hızlandırıcı rolü bulunmaktadır. Duodenal sitokrom B demir redüktaz (DCYTB) ilk tanımlanan ferreredüktazdır. DCYTB ve DMT1'in demir eksikliği ve hipoksiye yanıt olarak ekspresyonu artar ve demir alımında önemli rol üstlenirler (8). Bakır içeren, seruloplazmin homoloğu hephaestin, enterositleri terk eden Fe^{+2} 'yi Fe^{+3} 'e oksitleyen ve hücrenin bazolateral membranında yer alan bir proteindir (6). Bu protein demirin dolaşıma salınmasını ve transferrine bağlanmasını sağlar. Hephastin bir taşıyıcı değildir fakat demirin taşınmasını kolaylaştırır. Normal demir alımına rağmen hephaestin proteininin yapısı bozuk ise mikrositik anemi gelişir (9).

Enterositler tarafından emilen demir ya ferritin şeklinde depo edilerek enterositin yaşlanıp dökülmesi ile feçese atılır ya da plazmaya transfer edilir. Portal sirkülasyonda demir hızla transferine bağlanır. Transferrinin Fe^{+3} 'e yüksek afinitesi mevcuttur ve hızlıca demiri bağlar (7). Transferrin demir metabolizmasında ana rol oynar. Demire nerede ihtiyaç varsa oraya taşır. Hücrelerin çoğu demiri plazmadan transferrin aracılığı ile alır (6,10).

Hücrel olaylarda demir ihtiyacı olduğunda plazmadaki diferrik transferin (holotransferrin), ihtiyaca göre sentezi belirlenen ve hücre yüzeyinde bulunan transferin resöptörüne (TfR) bağlanır. Transferrin-TfR1 kompleksi hücre içine alınır ve bir endozom oluşur. Endozom içi pH düşürülerek, transferrin demirden ayrılır,

demir Fe^{+2} formuna redükte edilir (11). Endozomal membrandan demirin stoplazmaya geçişi DMT1 aracılığıyla olur. Sitoplazmada demir ya mitokondride hem sentezine ya ferritin şeklinde depolanmaya ya da diğer metabolik işlerde kullanılmaya gider. Demirini bırakmış transferrin yani apotransferrin- Tf-reseptör kompleksi tekrar hücre yüzeyine gönderilir ve transferrin tekrar kullanılmak üzere plazmaya salınır.

Plazmaya salınan transferin molekülü öncelikli olarak kemik iliğine gider. Eritroblast yüzeyinde reseptörle birleşince demir ayrılır ve hücre içine girer. Mitokondride protoporfirin halkasına bağlanarak hem oluşur. Hemoglobin yapımında kullanılır. Hemoglobin yapımında retiküloendotelyal sistemde bulunan makrofajlar tarafından fagosite edilen hücrelerden açığa çıkan demir de transferrin ile Kİ'ne taşınarak kullanılır (1,12). Hem dışında demir apoferritinle birleşerek ferritin şeklinde depolanır (1,4). Depo demiri vücuda demir alımı ve vücuttan demir kaybı ile değişen bir denge halindedir. Depo demiri ferritin ve hemosiderinden oluşur (4).

2.3. Karaciğerde Hematopoietik Süreçte Rol Alan Demir İlişkili Proteinler

2.3.1. Transferrin (TfR)

Transferrin ile taşınan demirin bir kısmı da hepatositlere girmektedir. Hepatositlerde iki ayrı genle kodlanan TfR1 ve TfR2 şeklinde, iki farklı transferrin reseptörü vardır. TfR1 enterosit kript bazolateral kısımda ve demiri transferrinden alan tüm hücrelerde milyonlarcası da kemik iliği eritrosit öncüllerinde bulunur. TfR2 ise; TfR1'in homoloğu olup bu reseptöre diferrik transferrin bağlanır. TfR1'in tersine tüm hücrelerde değil en çok karaciğerde, kan hücrelerinde, duodenal kript hücrelerinde bulunur. TfR2, TfR1 için de tanımlanan muhtemel reseptör aracılı endositoz mekanizması ile hepatositler tarafından transferrine bağlı demirin uptake'ine aracılık etmektedir. Ayrıca TfR2 demir depoları sinyallerini karaciğere iletmede önemlidir (13). TfR2 gen mutasyonunun herediter hemakromatosis'e yol açması ve hepsidin ile ilişkisi ortaya konmuştur (13). Serum transferrin reseptör (sTfR) düzeyi ölçümü direkt olarak organizmanın demire olan ihtiyacını göstermektedir. Ayrıca serum TfR'nin kaynağı olgunlaşan eritroid hücrelerden dökülen TfR olduğu için de serumda sTfR ölçümü eritropoetik aktivite düzeyini tahmin etmek amacıyla kullanılabilir.

TfR1; kript hücrelerinde eksprese edilen ve B2 mikroglobülin ile kompleks oluşturan HFE proteini ile bağlanır. Bunun sonucunda vücudun ihtiyacı olandan fazla demirin absorpsiyonu engellenmiş olur. HFE ile TfR 1 arasındaki etkileşim, birçok hücre tarafından transferrine bağlı demirin uptake'ine aracılık etmektedir ancak bunun biyolojik etkileri henüz net değildir (14).

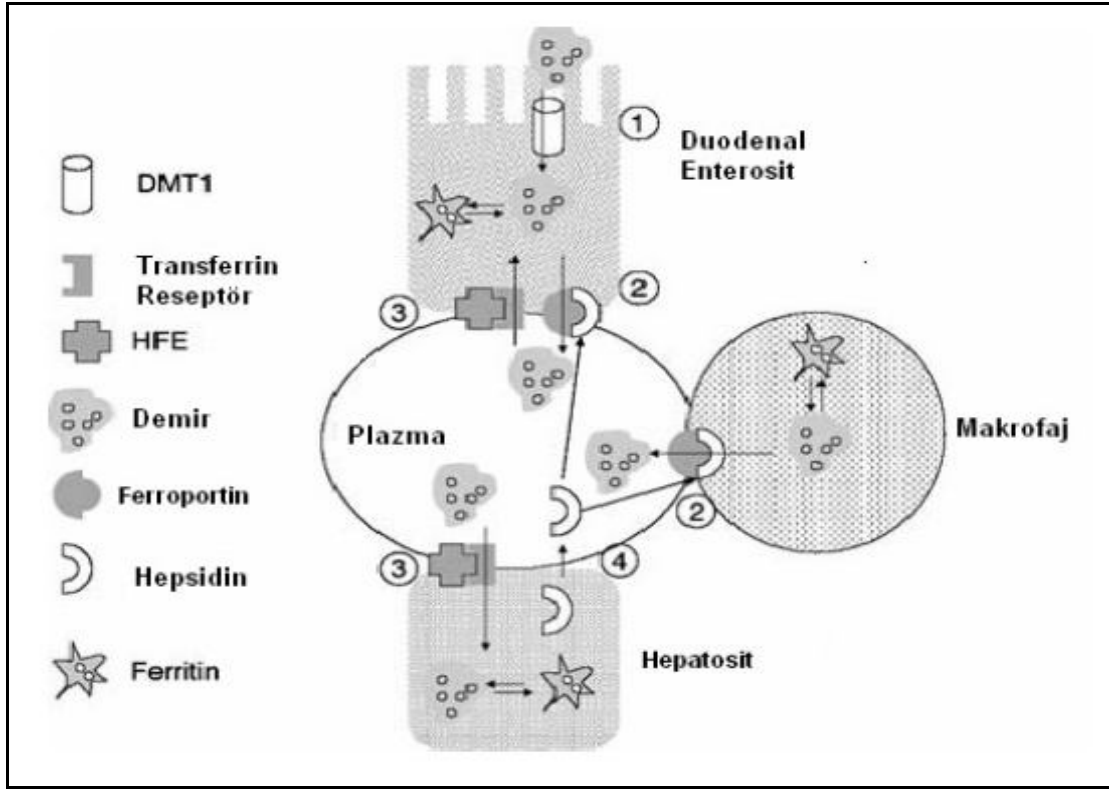
2.3.2. HFE

HFE proteini kromozom 6'nın kısa koluna lokalize HFE geni tarafından kodlanır, MHC sınıf 1 benzeri bir protein olup yüksek oranda hepatositlerde sentezlenir. HFE gen mutasyonu olan hastaların çoğunda hereditör hemakromatozis tip 1 gözlenir (15).

HFE proteini TfR kompleksi ile yakın ilişkilidir. HFE proteinin rolü net olarak bilinmemekle birlikte vücuttaki demir yükü durumuna göre hepsidin yanıtının düzenlenmesinde HFE-TfR kompleksi önemlidir. HFE mutasyonu olan hemakromatozisli hastalarda hepsidin düzeyi düşük saptanmış olup şelasyon tedavisine yanıt alınamamıştır (16).

Tablo 2.1. Demir homeostazisinde rol oynayan proteinler.

Protein	Eksikliğinde ortaya çıkan etki
Transferin	Demir artar
Transferrin reseptör 1	Letal etki, SSS demiri artar
Transferrin reseptör 2	Demir artar
DMT 1	Demir eksikliği
Ferritin H zinciri	Demir artar
Ferroportin	Makrofaj demiri artar
Seruloplazmin	Demir artar
Hephaestin	Demir eksikliği
HFE	Demir artar
Hepsidin	Demir artar
Hemojuvelin	Demir artar
GDF15	Demir eksikliği

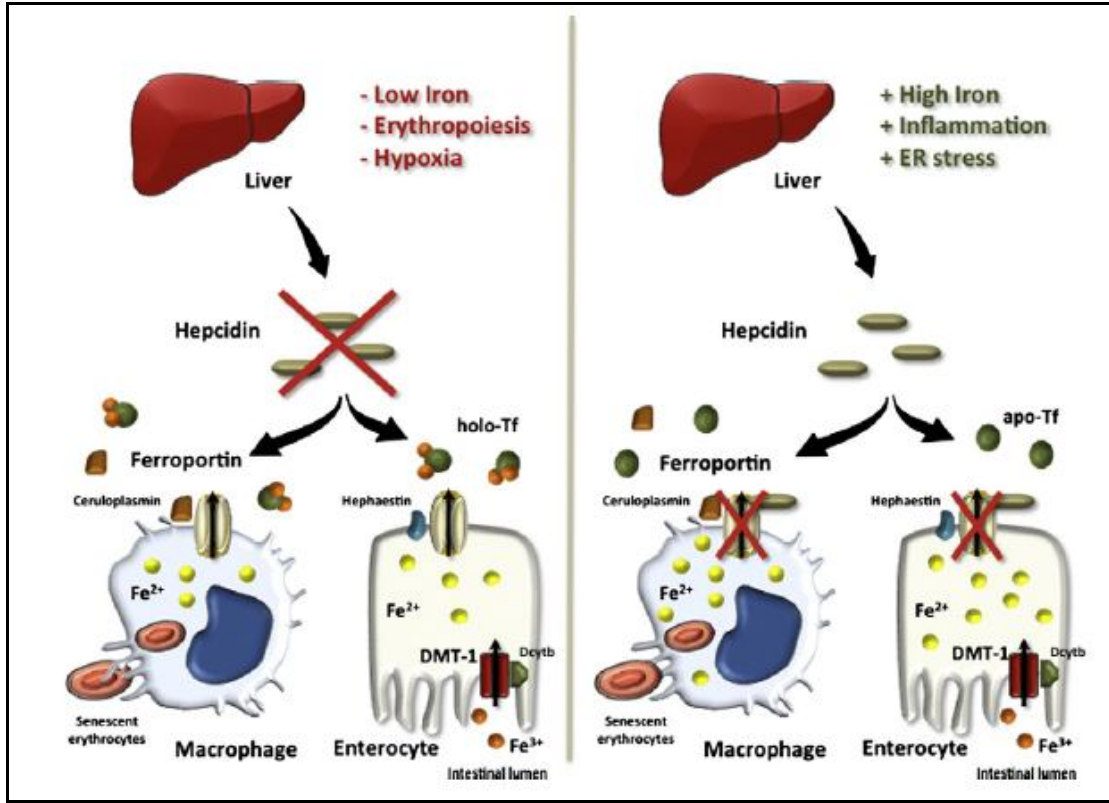


Şekil 2.2. Vücutta demir dengesi. **Birinci Basamak:** DMT1 aracılığıyla demirin matür enterositlerin içine alınışı. **İkinci Basamak:** Ferroportin aracılığıyla demirin enterosit ve makrofajlardan sirkülasyona geçişi. **Üçüncü Basamak:** Duodenal enterositlerde ve hepatositlerde transferin reseptör-2 ve HFE kompleksi aracılığıyla sirkülasyondaki demirin transferrine yüklenmesi. **Dördüncü Basamak:** Hepatositte hepsidin üretilmesi ve sirkülasyona salınımı (4).

2.3.3. Hepsidin

Hepsidin 25 aminoasit peptid yapısında olup, primer olarak karaciğerde sentez edilir. Böbrek, kalp, iskelet kasları ve beyin dokusundan da az miktarda salınır (17). Demir metabolizması üzerine negatif düzenleyici etkisi vardır. Demir birikimi ve yüksek demir içeren diyetle beslenme ile demir emilimini azaltmak için hepsidin sentezi artar (18). Anemi, hipoksi, inflamasyon durumlarında ise hepsidin sentezi azalır (19). Hepsidin bir akut faz reaktanıdır. Kronik hastalık anemisinin etiyolojisinde kilit rol oynar (20).

Hepsidin; demiri hücre dışına çıkarmakla görevli bir protein olan ferroportin (FPN) üzerine negatif düzenleyici olarak etki eder. Makrofaj, hepatositler ve enterositlerden demir salınımı bu mekanizma ile bloklanır (18). Hepsidin ayrıca demir emiliminde görevli olan DMT1 ve duodenal sitokrom B demir redüktaz (DCYTB) üzerine de negatif düzenleyici etkisi vardır (21).



Şekil 2.3. Demir metabolizmasının hepsidin ile regülasyonu (Gkouvatsos K, Papanikolaou G. Regulation of iron transport and the role of transferrin Biochimica et Biophysica Acta 2012; 1820: 188–202).

Hepcidin, FPN'nin ekstrasellüler kısmına bağlanarak FPN'in hücre içine alınmasına ve yıkılmasına neden olmaktadır (19). Barsak lümeninden enterosit içine demir transportu Divalent Metal Transporter (DMT1) proteiniyle sağlanırken enterosit içindeki demirin dolaşıma salınması FPN ile gerçekleştirilmektedir. FPN Epitelyal hücrelerin bazolateral membranında lokalizedir (21). Vücuttaki demir döngüsü ile hepatosit ve makrofaj hücreleri içine alınmış olan demirin dolaşıma geçişini de FPN proteini sağlamaktadır. FPN ekspresyonunun demir ve inflamatuvar uyarılara cevap olarak arttığı gösterilmiştir (22). Enterositler, makrofajlar ve hepatositlerde eksprese olan FPN proteini fonksiyonunun ana düzenleyicisi Hepsidin'dir.

Hepatositler tarafından sentezlenen Hepsidin ekspresyonunda çeşitli proteinlerin karmaşık bir şekilde etkileşimi söz konusudur (23,24). Hepsidin geni transkripsiyonu esas olarak SMAD ailesi transkripsiyon faktörlerince uyarılmaktadır (25). TGFbeta/BMP sinyal ileti yolağında yer alan SMAD proteinleri, hücre membranındaki BMP reseptörlerince aktive edilmektedir. Buna bağlı olarak Hepsidin ekspresyonunu artıran SMAD proteinlerinin aktivitesi BMP uyarımı ile doğrudan ilişkilidir. Hepatositlerde Hepsidin ekspresyonunu BMP2, BMP4 ve BMP 6 proteinlerinin uyarabildiği belirlenmiştir (26). BMP6 ile BMP4 reseptörlerinin uyarılmasında hemojuvelin (HJV) proteininin de yardımcı rol üstlendiği gösterilmiştir (27).

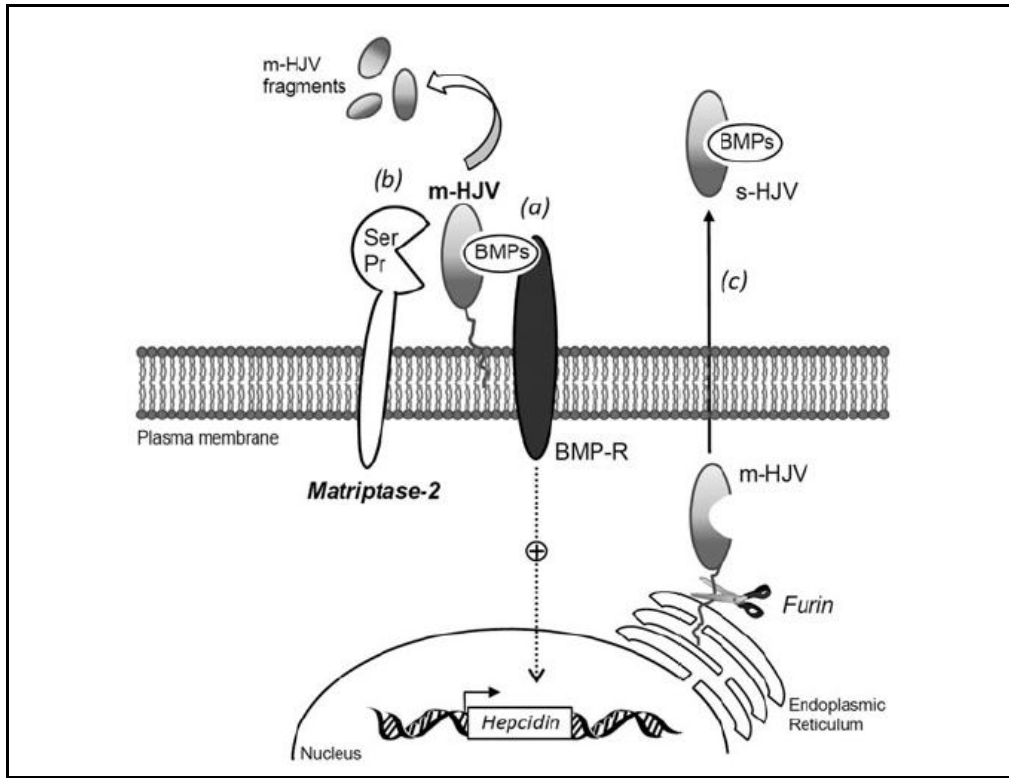
2.3.4. Hemojuvelin

HJV; GIP (glikofosfotidil inozitol) bağlı bir membran proteinidir (28). Kromozom 1q21 bölgesine lokalize HFE2 geni ile kodlanır. Yapılan klinik çalışmalar HFE2 genindeki homozigot ya da heterozigot mutasyonların juvenil hemakromatozise yol açtığını göstermiştir.

HJV çoğunlukla KC, iskelet sistemi kasları ve kalpten salınır. HJV bir BMP koreseptörü gibi davranır ve BMP/SMAD ileti yolağı aracılığıyla KC’de Hepsidin ekspresyonu ve regülasyonunda rol oynar (29). Yapılan daha önceki çalışmalarda özellikle KC’deki HJV mutasyona uğratarak yok edilen ratlarda KC’deki hepsidin üretiminin azaldığı ve KC, kalp, pankreas demir depolarının miktarında artış olduğu fakat doku makrofajlarındaki demir seviyelerinin azaldığı saptanmıştır (30).

Hemojuvelinin 2 formu bilinmekte olup, hücre membranına bağlı HJV; BMP koreseptörü gibi davranır, KC’de hepsidin sentezini artırır. GPI-bağlı membran proteinleri gibi proteolitik bölünme veya fosfolipazlar ile çözünür formda HJV (sHJV) oluşur. Yapılan çalışmalarda HJV’nin hücrelerden sHJV olarak atıldığı ya da sekrete edildiği düşünülmekte olup, bu formun BMP ligandlarına seçici olarak bağlandığı ve endojen BMP bağımlı Hepsidin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (31). Yeni yapılan çalışmalarda insan serumunda da sHJV varlığı gösterilmiştir (32).

Membran'a bağılı HJV (mHJV) hücre yüzeyinde BMP aracılığı ile hepsidin ekspresyonunu artırır. Matriptase 2 ise; demir metabolizmasında önemli role sahip yeni tanımlanan genlerdendir (33). Matriptase 2 serin proteaz içeren bir plazma membran proteini olup, BMP sinyalini ve hepsidin ekspresyonunu mHJV'nini parçalayarak baskılar (34). Böylelikle hepsidin ekspresyonunda belirgin inhibisyona neden olarak demir yüklenmesine neden olur.



Şekil 2.4. BMP bağımlı HJV sinyal yolağı ve hepsidin ekspresyonunun MTP-2 tarafından inhibisyonu (Mitchell D Knutson Into the matrix: regulation of the iron regulatory hormone hepcidin by matriptase-2 Nutrition Reviews® 67(5):284–288 doi:10.1111/j.1753-4887.2009).

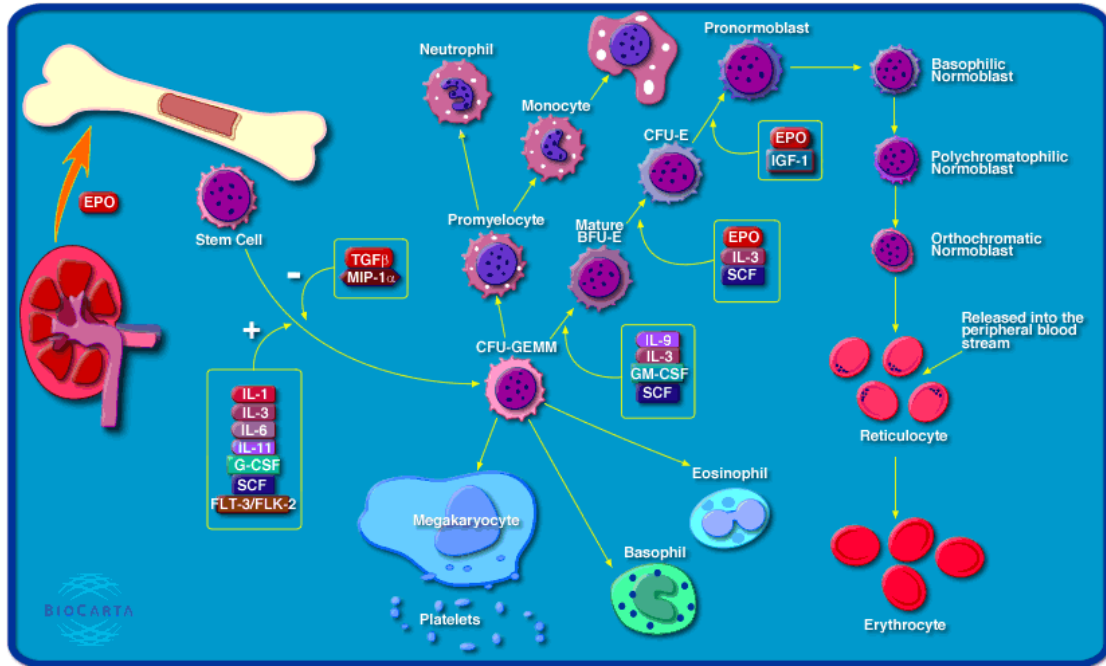
2.4. Kemik İliğinde Hematopoietik Süreçte Rol Alan Demir İlişkili Proteinler

Eritropoiez pluripotent kök hücrelerin primitif eritroid progenitor hücrelere dönüşümü ile başlar. Bu eritroid progenitor hücreler spesifik bir diferansiasyon programı ile eritrosite kadar dönüşüm gösterir. Bu süreçte çeşitli transkripsiyon

faktörleri, adezyon molekülleri ve hematopoietik büyüme faktörleri etkinlik göstermektedir.

İnsanlarda tanımlanan en primitif eritroid progenitor hücre erythroid burst-forming unit (BFU-E)'dir. BFU -E; EPO, SCF, IL-3, GM-CSF gibi büyüme ve diferansiyasyon faktörlerinin etkisiyle bir diğer eritroid öncü hücre formu olan colony-forming units (CFU-E)'e farklılaşır (35). CFU-E kemik iliğinde eritroid serinin morfolojik olarak en büyük hücresi olan proeritroblastların öncü hücresidir. Proeritroblasttan sırası ile bazofilik eritroblast, polikromatik eritroblast, ortokromotik eritroblast, retikülosit ve olgun eritrosit formları oluşur (Şekil 2.5). Bu dönüşüm sürecinde morfolojik olarak en büyük hücre proeritroblast olup dönüşüm sırasında hücrelerin boyutlarının giderek küçülmektedir. Ayrıca bu dönüşüm sırasında proeritroblasttan eritrosite doğru sitoplazma renginde koyu bazofilik rengin açılarak eozinofilik renge dönüşüm gösterdiği, nükleusların da belirgin derecede küçüldüğü ve yuvarlak şekil aldığı görülmektedir (Şekil 2.5).

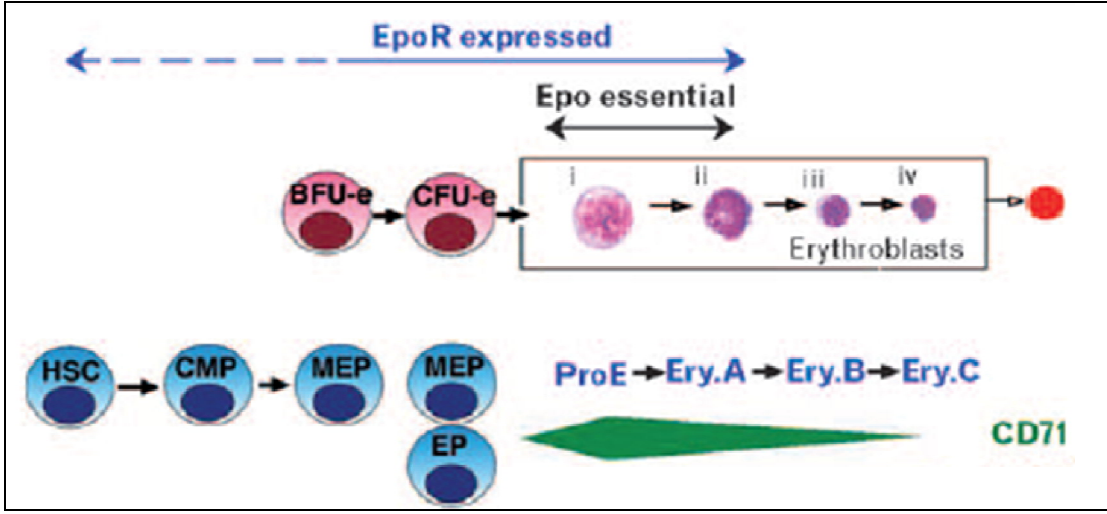
Böbreğin jukstaglomeruler apparatusundaki hücrelerden doku hipoksisine yanıt olarak sentezlenen EPO'nin erken hematopoietik hücreler ya da 'burst forming unit-eritroid (BFU-E) denilen en erken saptanabilen eritroid öncüllerin üretilmesi ve sürdürülmesindeki rolü az olmakla birlikte, kemik iliğinde BFU-E'nin geç eritroid öncül hücreler olan colony forming unit-eritroid (CFU-E)'e ve proeritroblastlara olgunlaşmasını sağlar (36). Temel etki mekanizması eritroid öncül hücrelerin programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisini önlemek ve onların çoğalma ve gelişimine izin vermektir (37).



Şekil 2.5. Eritroid seri öncüllerinin diferansiasyon sürecindeki değişimleri (http://www.biocarta.com/pathfiles/h_erythPathway.asp)

Yapılan çalışmalarda eritropoietin ya da EpoR geninde mutasyon olan ratlarda eritroid seride duraklama olduğu saptanmış, özellikle CFU-E farklılaşması için EPO'ya gereksinim olduğu belirtilmiştir (38). Şekil 2.5'de de görüldüğü gibi geç eritroblastlar (polikromotik ve ortokromatik) EPO bağımsızdır, EpoR'ü eritrosit gelişim sürecinde progenitör hücrelerin farklılaşması ve proeritroblast / bazofilik eritroblast aşamalarında etkilidir.

Eritroid hücrelerdeki transferrin reseptörü 1 yüzey ekspresyonu (CD71) flow sitometrik analizle değerlendirildiğinde ise; CD 71 ekspresyonun proeritroblast, bazofilik eritroblast, polikromotik eritroblastta yüksek seviyede; ortokromotik eritroblastta ise düşük seviyede eksprese olduğu görülmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Eritroid progenitör hücrelerin morfolojik ve CD71 yüzey ekspresyonu değişiklikleri.

2.5. Demir Yüklenmesine Neden Olan Klinik Durumlar

Vücutta demir yüklenmesi, plazmadaki demir miktarının transferrin bağlama kapasitesini aşması ve demir depolarının yeterli olmasına karşılık enterositlerdeki demir emiliminin baskılanamaması ile gerçekleşmektedir. Bu şekilde demir yüklenmesine neden olan durumlar içinde herediter hemakromatozis ve hemoglobinopatiler gibi genetik hastalıklar; ineffektif eritropoez; ayrıca aplastik anemi ve myelodisplastik sendrom gibi edinsel hastalıklar yer alır (39).

Herediter hemokromatoz hastalıklarında demir metabolizmasında rol alan genlerdeki mutasyonlar nedeniyle fonksiyon bozuklukları oluşmakta ve ilişkili dokularda toksik demir birikimi olduğu gözlenmektedir. Tip 1 hemokromatozda HFE, Tip 2A HJV, Tip 2B Hepsidin ve Tip 3 hemakromatozda Transferrin Reseptörü II (TfRII) genlerinde mutasyonlar bulunmakta ve otozomal resesif olarak kalıtılmaktadırlar. Bu mutasyonların varlığı ile Hepsidin miktarları azalmakta, intestinal demir emilimi, kandaki ve dokulardaki demir miktarı artmaktadır (40). Tip 4 hemokromatoz otozomal dominant olarak kalıtılmakta olup, FPN genindeki mutasyonlar nedeniyle protein fonksiyonunun kaybı söz konusudur (41,42). Bu hastalıkta Hepsidin fonksiyonu ve miktarı değişmemekte ancak hepatosit veya makrofajlarda demir birikimi gözlenmektedir (43).

Hemoglobinopatiler gibi yetersiz eritropoeze neden olan eritroid bozukluklarda da klinik olarak hemokromatoza benzer fenotip geliştiği bilinmektedir (44). Yetersiz eritropoezde kemik iliğindeki immatür eritroblastlardan, ihtiyacı karşılayacak seviyede eritrosit üretilmemesi söz konusudur (45). Böylece anemi, doku hipoksisi ve eritropoetin salınımında artış gerçekleşmektedir. Yüksek eritropoetin seviyelerine sahip bu bireylerde eritrosit miktarları artmadığından doku hipoksisi de devam etmekte, kemik iliği eritroblastlarla hiperselüler hale gelmektedir.

Kronik enflamasyon veya kronik hastalıklarda ayrıca tümör hücrelerinde, sitokin salınımındaki artışa bağlı olarak hepsidin düzeyi artar ve demir yüklenmesi söz konusu olabilir (46,47).

Demir birikiminin bir diğer nedeni çeşitli edinsel ya da kalıtsal hastalıklara bağlı olarak gelişen ihtiyacı karşılamak için yapılan tekrarlayan kan transfüzyonlarıdır. Demir birikimi ile organ yetmezliği gelişen bu hastalarda demir şelasyonu tedavisi yapılarak hastalık prognozunda iyileşme sağlanmaktadır (48).

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden sağlanan Wistar –Albino cinsi 12-16 haftalık, ağırlıkları 272- 443 gram arasında olan 20 adet erkek rat kullanıldı. Çalışmadaki ratların tümü deney süresince standart nem, ışık ve oda ısısı koşullarında bulunduruldu, yeterli miktarda içme suyu ve standart rat pellet yemi ile beslendi.

3.2. Metod

3.2.1. Deney gruplarının oluşturulması ve deneyin yapılması

Biri kontrol grubu diğeri deney grubu olmak üzere 10’ar adet rattan oluşan 2 grup oluşturuldu.

Grup 1 (kontrol grubu: 10): Haftada 3 defa olmak üzere 2 hafta boyunca 5 ml serum fizyolojik intraperitoneal (i.p) olarak verildi.

Grup 2 (deney grubu: 10): Haftada 3 defa olmak üzere 2 hafta boyunca 100 mg / kg demir dextran (Ferric hydroxid dextran / Cosmofer®) i.p. olarak verildi.

Demir uygulaması sonrasında demirin emilimi ve kemik iliği üzerindeki etkilerinin ortaya çıkması için 2 haftalık bekleme süresi uygulandı.

3.2.2. Doku örneklerinin alınması ve örneklerin homojenizasyonu

Ratlara 2 hafta boyunca haftada 3 gün i.p. olarak enjeksiyon ve takip eden 2 hafta bekleme süreci sonrasında eter ile anestezi uygulandıktan sonra karın orta hat median insizyon ile açılarak sonra abdominal aortadan kan örnekleri alınmıştır. Sakrifiye edilen ratlardan karaciğer doku örnekleri ve kemik iliği eldesi için femur örnekleri alınmıştır. Femur boyunca komşu dokular uzaklaştırılıp matkap ve penset yardımıyla kemik dokusu inceltilmiş ve kemik iliğine zarar verilmeden femur longitudinal olarak açılmıştır. Penset yardımıyla kemik iliği dokusu kazınıp heparinli izotonik tampon sıvısı içine toplanmış, pipetaj ile kemik iliği dokusu içindeki hücrelerin, heparinli izotonik tampon sıvısında homojen dağılımları sağlanmıştır. Eritroblastlardaki hücre yüzey antijenleri flow sitometri yöntemi ile 24 saat içinde

incelenmiştir. mRNA ekspresyon analizleri için kemik iliği örnekleri lize edilip -20°C’de saklanmıştır.

Kontrol ve demir uygulanan ratlara ait kan örneklerinden plazma sıvıları ayrılıp -20°C’de saklanmış, kan örneklerinden 24 saat içinde hemogram, retikülosit, demir ve demir bağlama kapasitesi ölçümleri yapılmıştır. Karaciğer doku örnekleri soğuk izotonik tampon içinde yıkanıp RNA izolasyonuna kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.2.3. Örneklerin deney için hazırlanması

Kontrol ve demir uygulanan ratlara ait kan örnekleri heparinli veya EDTA’lı tüplere alınıp santrifüj edildi. Plazma sıvıları ve hücre pelletleri -80°C’de saklandı. Serum örnekleri demir ölçümü için -20°C’de saklandı. Karaciğer doku örnekleri soğuk izotonik tampon içinde yıkanıp hızla işaretli tüplere alınarak ve -80°C’de saklandı. Heparinli izotonik tampon sıvısı içine toplanan kemik iliği örnekleri santrifüj edilerek hücre pelleti RNA izolasyon kitinde yer alan hücre lizis tamponu (Lysis Buffer RA1) içinde -80°C’de saklandı.

3.2.4. Gen ekspresyonu analizleri

Kontrol grubunda ve demir uygulanan ratlarda, kemik iliği ve karaciğerde demir metabolizmasında rol alan genlerdeki mRNA ekspresyonu değişimleri kantitatif PCR yöntemiyle incelenmiştir. Kemik iliğinde TfR1, TfR2 ve EPOR gen ekspresyonları; karaciğer dokusunda ise TfR1, TfR2, EPOR, HFE, Hepsidin gen ekspresyonları incelenmiştir.

Saklanan doku ve hücre örneklerinden silakolon yöntemi ile total RNA izole edilip (Nucleospin RNAII - Macherey nagel) RNA miktarı spektrofotometrik olarak saptanmıştır. RNA kalıbı kullanılarak reverse transcriptase enzimi ve random primer’ler ile (Fermentas) cDNA sentezlenmiştir. Hedef genlere ait primer çiftleri kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif PCR (Fermentas) yapılmış, referans olarak Beta Aktin geni kullanılmıştır. PCR verileri REST programı ile analiz edilmiştir.

3.2.5. ELISA analizleri

Demir metabolizmasında rol alan plazmadaki protein seviyesi değişimleri ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol ve demir uygulanmış ratlardan

alınan plazma örneklerinde Ferritin (ICL INC, USA), Hepsidin (Uscn, China), HJV (Uscn, China) protein miktarları incelenmiştir.

3.2.6. Flow sitometri analizleri

Kemik iliğindeki eritroblastik hücre sayılarının ve yüzey protein ekspresyonlarının analizi flow sitometri yöntemiyle ve FACS DİVA® (BD) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Eritroblastların kemik iliği hücre popülasyonu içinden seçilmesi amacıyla rat eritropoetik hücre spesifik APC işaretli antikor (Eritroblast hücrelerine özgü global antijen, 550962, BD) kullanılmıştır. Eritroblastik hücre yüzeyinde bulunan TfR1 (CD71) protein miktarlarındaki değişimler FITC işaretli anti-TfR1 antikor (554890, BD) kullanılarak direkt boyamayla incelenmiştir. TfR1 ve eritroblast spesifik proteinleri birlikte taşıyan hücreler kemik iliğindeki total eritroblastik hücre popülasyonu olarak kabul edilmiştir. Total eritroblastik hücre popülasyonu, TfR1 proteini ekspresyon seviyesi miktarına ve hücre büyüklüğüne (FSC) göre incelenip erken ve geç dönem eritroblastik hücreler olarak ayrılmıştır. Bu hücrelerin total eritroblastik hücre popülasyonu içindeki dağılımları yüzdelik değerlerine göre karşılaştırılmıştır.

3.3. İstatistiksel Analiz

Kontrol ve demir uygulanan rat grupları arasında ortalama değerler Mann Whitney testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde Graph Pad PRİZM4.0® programı kullanılmıştır. p değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demir Uygulamasının Sistemik Dolaşımdaki Demir ve Eritroid İndeksler Üzerine Etkisi

Ratlara i.p. olarak demir dextran uygulamasının sistemik dolaşımda yol açtığı değişimlerin belirlenmesi amacıyla kan örneklerinde demir miktarı, demir taşınması ve demir depolanması ile ilgili belirteçlerdeki değişimler incelenmiştir. Serum demir miktarının; demir uygulanan deney grubu ratlarda kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat yüksek olduğu saptanmıştır ($p= 0,0001$) (Tablo 4.1.). Total demir bağlama kapasitesi (TDBK) değişimleri incelendiğinde, deney grubu ratlarda kontrole göre yaklaşık olarak 10 katlık azalma olduğu saptanmıştır ($p= 0,0001$). Depo demir miktarının göstergesi olan serum ferritin miktarları ELISA yöntemi ile incelendiğinde, deney grubu ratlarda kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 17 katlık bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$) (Tablo 4.1.).

Demirin kemik iliğindeki eritropoetik öncül hücreler tarafından hemoglobin sentezinde yoğun olarak kullanılması nedeniyle, demir yüklenmesinin sistemik dolaşımda demir ilişkili parametrelerde nasıl bir değişime yol açığının belirlenmesi için hemogram ölçümleri gerçekleştirilmiş ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Hemoglobin, HCT, MCV, RBC ve retikülosit değerlerinde gruplar arasında farklılık saptanmamıştır. Bununla birlikte anizositozun göstergesi olan RDW değerinde deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğunu belirlenmiştir ($p= 0,0001$) (Tablo 4.1.).

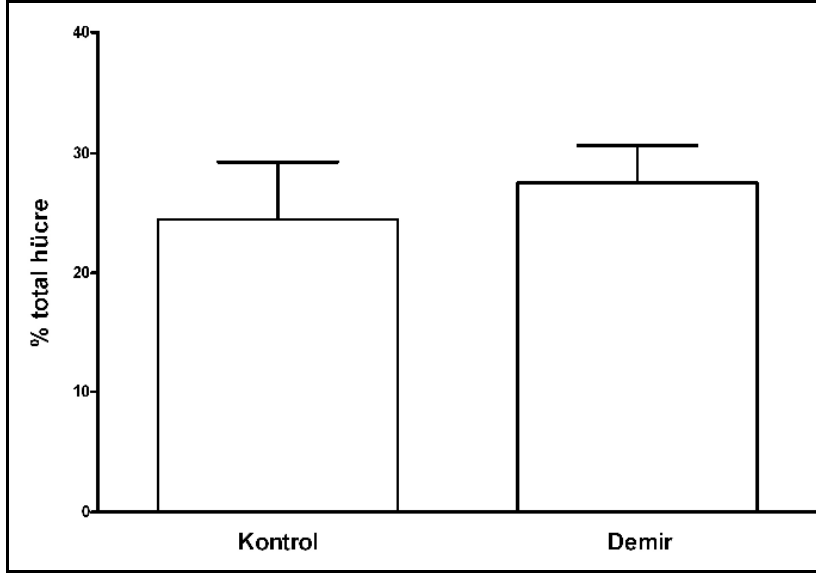
Tablo 4.1. Kontrol ve Deney grubunda hemogram ve biyokimyasal ölçüm sonuçları.

	KONTROL Ort $\pm$ Std Sapma	DENEY Ort $\pm$ Std Sapma	<i>p</i> değeri*
HB (g/dL)	14,7 $\pm$ 0,5	15,0 $\pm$ 0,6	<i>p</i> > 0,05
HCT (%)	47 $\pm$ 2	47 $\pm$ 4	<i>p</i> > 0,05
MCV (fL)	53 $\pm$ 3	56 $\pm$ 3	<i>p</i> > 0,05
RDW (%)	12 $\pm$ 0,3	15 $\pm$ 0,6	0,0001
WBC (10e3/ μL)	4,8 $\pm$ 3,9	5,3 $\pm$ 1,6	<i>p</i> > 0,05
RBC (10e6/μL)	8,8 $\pm$ 0,4	8,4 $\pm$ 0,2	0,0524
PLT (10e3/μL)	752 $\pm$ 207	568 $\pm$ 140	<i>p</i> > 0,05
Retikülosit (%)	2,3 $\pm$ 0,8	2,4 $\pm$ 0,4	<i>p</i> > 0,05
Demir (μg/dL)	168 $\pm$ 19	553 $\pm$ 54	0,0001
TDBK (μg/dL)	371 $\pm$ 58	38 $\pm$ 9	0,0001
Ferritin (ng/mL)	147 $\pm$ 44	2514 $\pm$ 403	0,0001

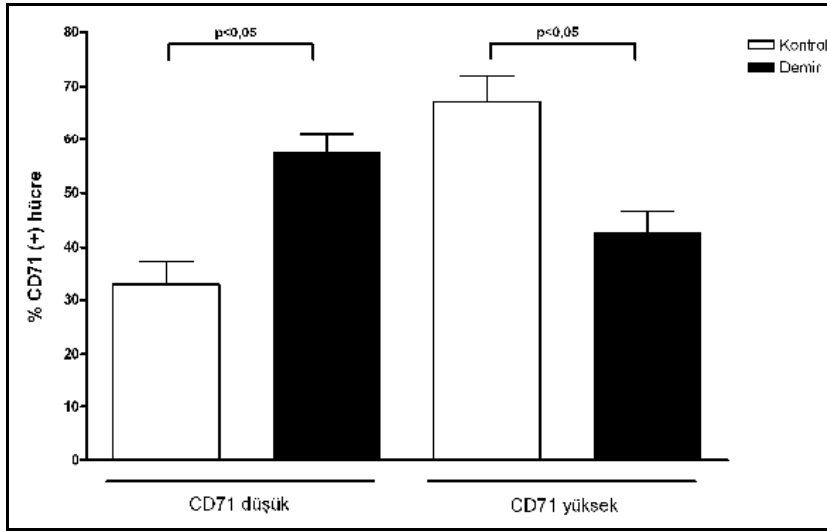
* Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır.

4.2. Kemik İliğindeki Eritroid Hücre Özelliklerinin Flow Sitometri Yöntemi İle İncelenmesi

Kemik iliği örneklerinde eritroid hücrelerdeki CD71 proteininin hücre yüzeyindeki miktarları flow sitometri yöntemi ile incelendiğinde kemik iliğindeki total eritroid hücreler içinde CD71(+) olan hücre düzeyinin demir uygulanan ratlarda değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.1). CD71(+) olan hücreler içinde CD71 ekspresyon düzeyi yüksek ve düşük olanlar kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Demir uygulanan ratlarda CD71 ekspresyonu yüksek hücre düzeyinin azaldığı ancak CD71 ekspresyonu düşük hücre düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.4, Şekil 4,5)

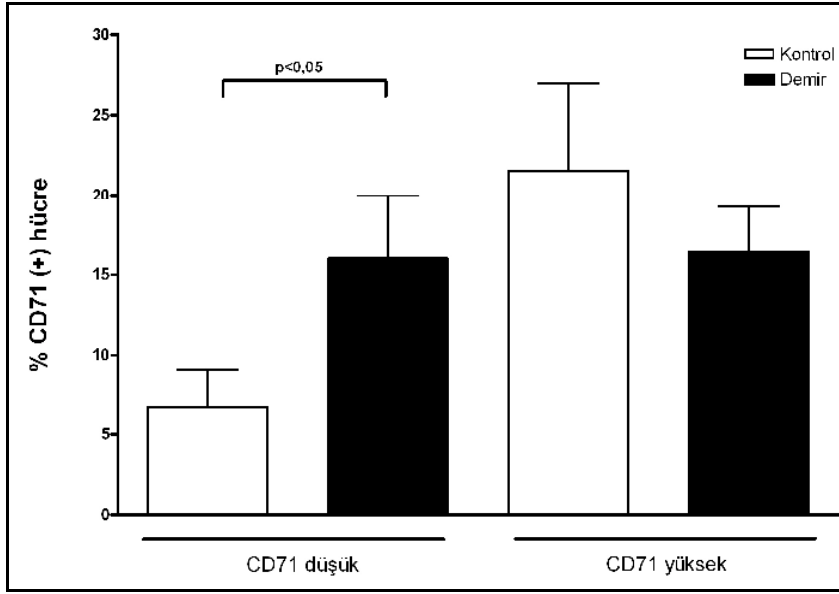


Şekil 4.1. Kİ'deki tüm hücreler içinde CD71 (+) hücre dağılımı.

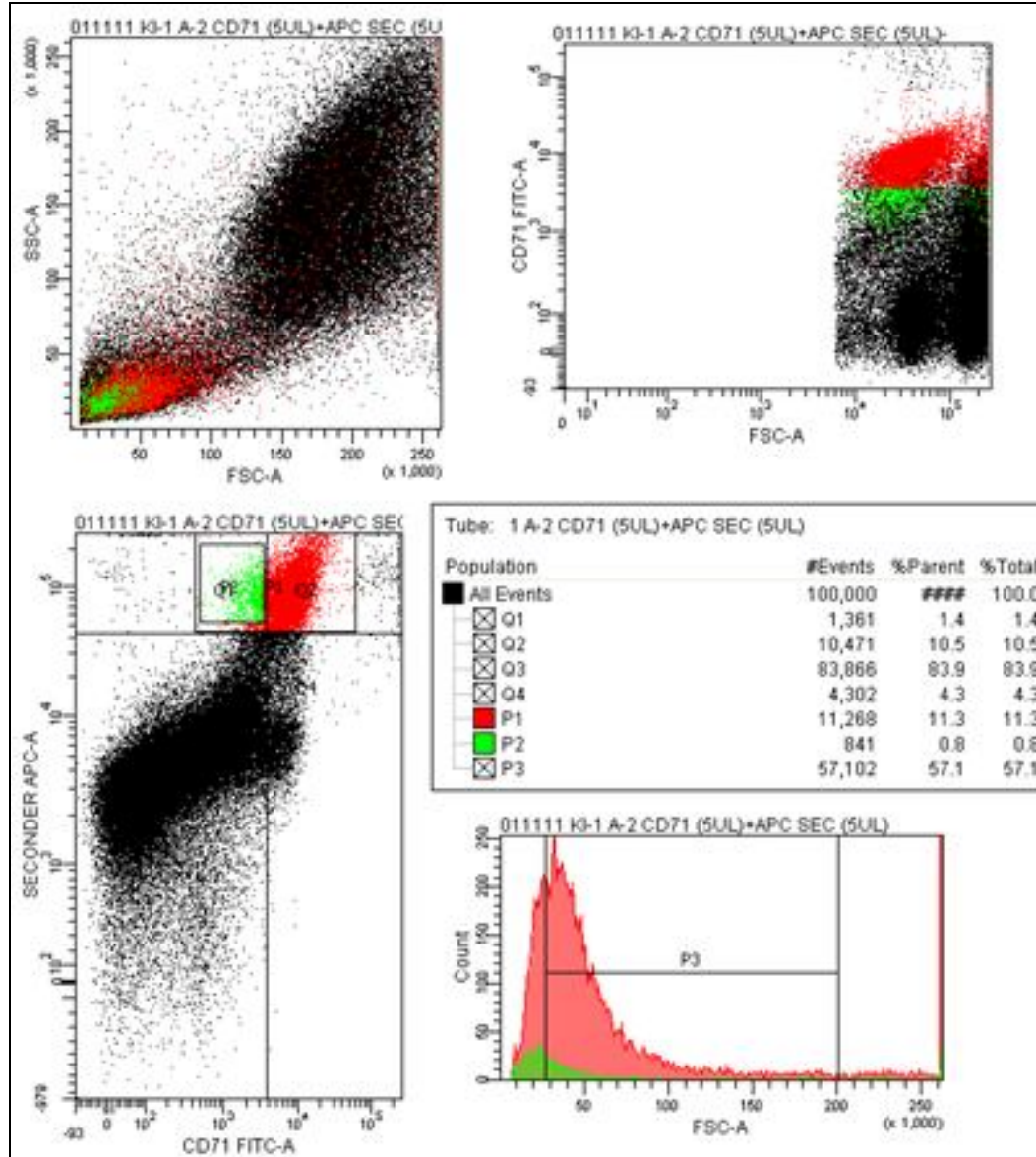


Şekil 4.2. Eritropoetik hücrelerde CD71 ekspresyonu seviyesine göre dağılım yüzdeleri.

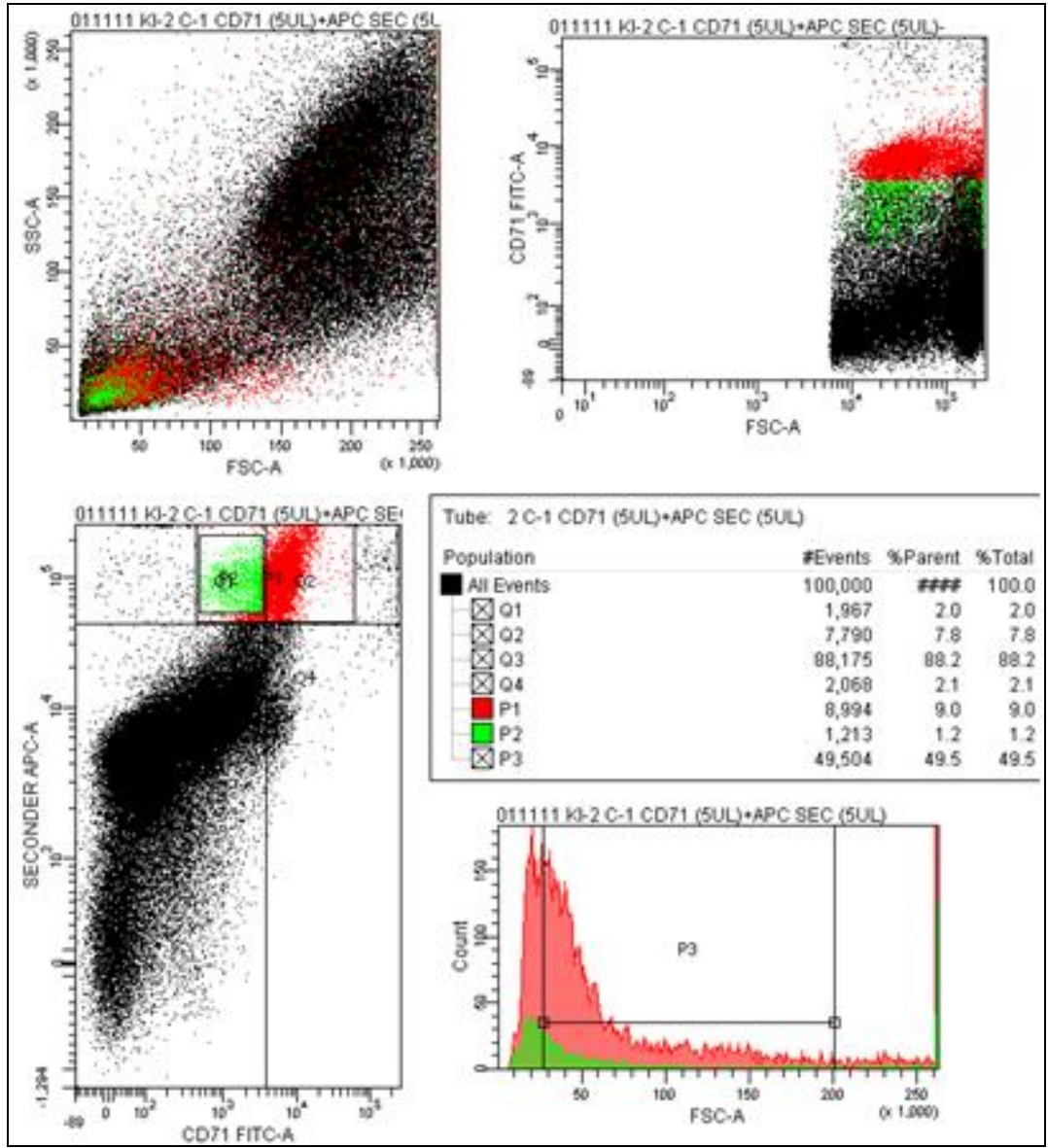
Hücre morfolojisinde gerçekleşen değişimlerin, demir uygulamasından nasıl etkilendiğinin belirlenebilmesi amacıyla eritroid hücreler büyüklüklerine (FSC) göre incelenmiştir. CD71 yüzey ekspresyonu yüzdesi yüksek ve düşük olan eritroid hücreler ayrıca büyüklük dağılımlarına göre de analiz edilmiştir. Demir uygulanan ratlarda CD71 ekspresyonu yüksek olan eritroid hücrelerde morfolojik olarak bir değişim gözlenmemiştir ($p>0,05$). Buna karşın CD71 ekspresyonu düşük olan hücreler içinde morfolojisi büyük olan hücre yüzdesinin arttığı ortaya çıkmıştır (Şekil 4.3, Şekil 4.5)



Şekil 4.3. CD71(+) ve morfolojisi büyük (FSC yüksek) hücrelerin yüzde dağılımı.



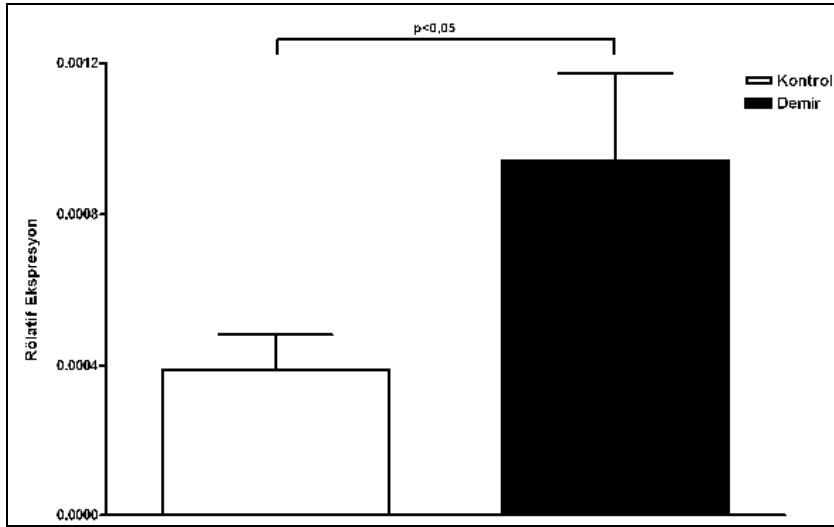
Şekil 4.4. Eritropoetik hücrelerin CD71 ekspresyonu düzeyine ve hücrelerin büyüklüğüne göre dağılımları- Kontrol Grubu (P1:Eritroblast Populasyonu, P2: CD71 Düşük Eksprese Eden Eritroblast Populasyonu)



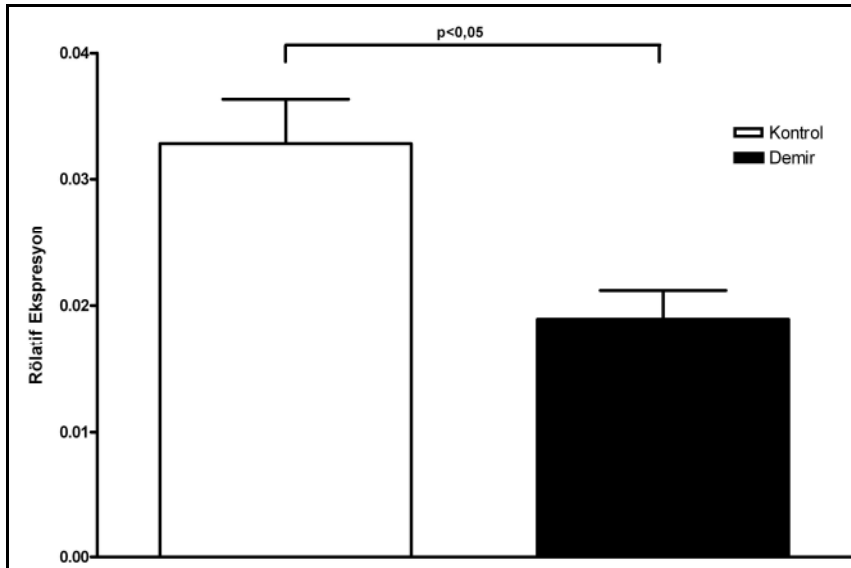
Şekil 4.5. Eritropoetik hücrelerin CD71 ekspresyonu düzeyine ve hücrelerin büyüklüğüne göre dağılımları- Deney Grubu (P1:Eritroblast Populasyonu, P2: CD71 Düşük Eksprese Eden Eritroblast Populasyonu).

4.3. Kemik İliğindeki Hedef Gen mRNA Ekspresyonlarının İncelenmesi

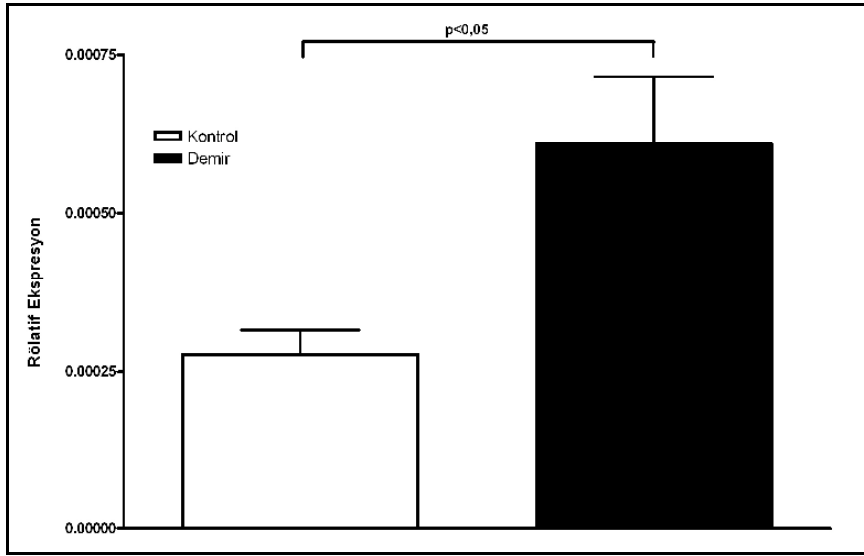
Ratlara demir uygulaması sonrasında kemik iliği hücrelerindeki TfR I/II ve EpoR genlerindeki değişimler mRNA seviyesinde analiz edildiğinde EpoR gen ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). TfR I gen ekspresyonunda ise demir uygulanan ratlarda anlamlı bir düşüş saptanmıştır (Şekil 4.7). Kemik iliğinde Tip I'e göre daha az eksprese olan Tip II transferrin reseptörü gen ekspresyonunda ise anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.6. Kİ EpoR ekspresyonu değişimleri.



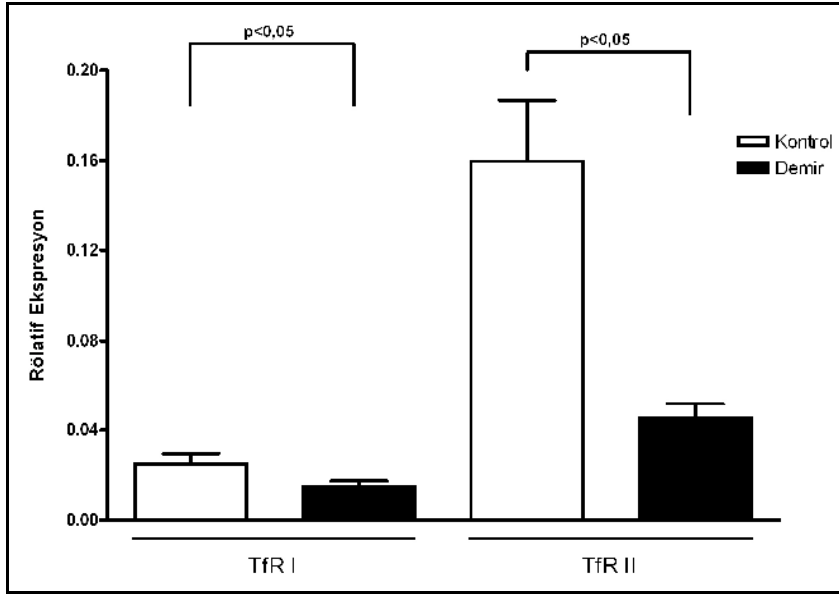
Şekil 4.7. Kİ TfR I ekspresyonu değişimleri.



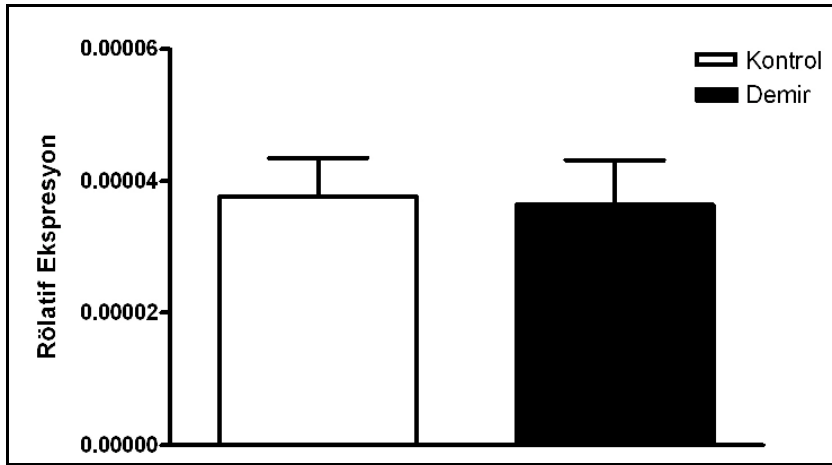
Şekil 4.8. Kİ TfR II ekspresyonu değişimleri.

4.4. KC Hedef Gen mRNA ve Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Demir uygulanan ratlarda karaciğerdeki tip I ve tip II transferrin reseptörlerinin mRNA ekspresyonu seviyesinde gösterdikleri değişimler incelendiğinde her iki tip reseptörde de azalma olduğu görülmüştür. Normalde hepatositlerde gen ekspresyonu TfR I'e göre daha yüksek olan TfR II gen ekspresyonunun yaklaşık olarak 3 kat azaldığı saptanmıştır. TfR I ekspresyonu da hafif ancak anlamlı seviyede azalmıştır (Şekil 4.9). Karaciğerdeki EpoR ekspresyonunda ise değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.10).



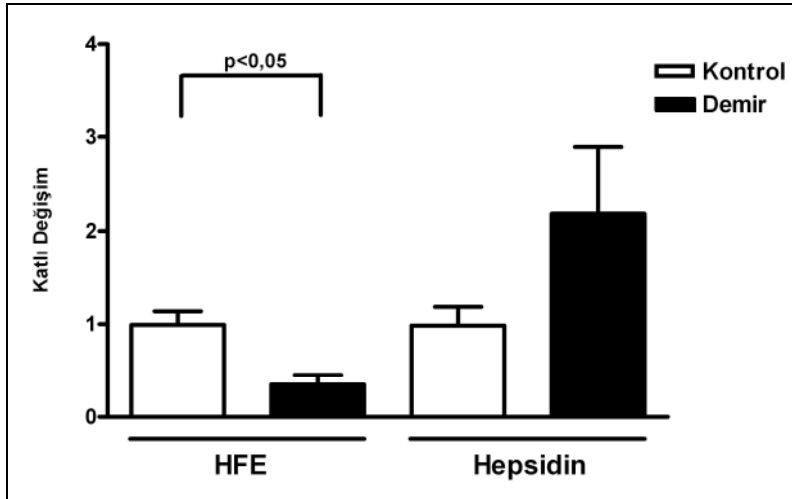
Şekil 4.9. Karaciğerde TfR I/II ekspresyon değişimleri.



Şekil 4.10. Karaciğerde EpoR ekspresyon değişimleri.

Demir verilen ratlarda karaciğerdeki Hepsidin gen ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.11).

HFE geni incelendiğinde ise; mRNA ekspresyonunun demir yüklenmesi ile azaldığı belirlenmiştir ($p=0,002$) (Şekil 4.11)



Şekil 4.11. Karaciğerde HFE ve Hepsidin genleri ekspresyon değişimleri.

ELISA yöntemi ile yapılan analizlerde Hemojuvelin serum seviyelerinde demir yüklenmesi sonrasında yaklaşık 3 katlık bir azalma saptanmıştır (Tablo 4.2).

Hepsidin seviyelerinde ise hafif bir düşme saptanmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kontrol ve Deney grubunda serum hepsidin ve sHJV düzeyleri.

	<u>KONTROL</u> ORT ± STD SAPMA	<u>DENEY</u> ORT ± STD SAPMA	<i>p</i> değeri*
Hepsidin (pg/mL)	1562 ± 655	984 ± 675	0,06
sHJV (pg/mL)	3212 ± 2505	965 ± 929	0,0232

* Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Demir metabolizması vücutta tüm organ fonksiyonları açısından büyük önem taşımaktadır. Demir eksikliği veya fazlalığı olan hastalıklarda başlıca eritropoetik sistemin ve karaciğerin etkilendiği görülmektedir. Demir eksikliği durumlarında öncelikle eritropoetik sistem etkilenmekte, karaciğer dokusunda da demir alımını arttıracak değişimler meydana gelmektedir. Demir fazlalığı durumlarında ise öncelikle karaciğer fonksiyonları bozulmaktadır ve karaciğer dokusu demir birikimini azaltacak mekanizmaları aktif hale geçirmektedir.

Demir birikimine neden olan hastalıkların başında genetik hemokromatik hastalıklar ve inefektif eritropoetik hastalıklar gelmektedir. Hemokromatik hastalıklarda karaciğer fonksiyon bozuklukları görülmektedir ancak kemik iliği normal olarak çalışmaya devam etmektedir. Demir birikimine karşı kemik iliğinin nasıl yanıt verdiği ve normal fonksiyonlarını nasıl devam ettirdiği henüz tam olarak bilinmemektedir.

Demir fazlalığından etkilenen sistemlerin incelenmesi amacıyla ratlara ve farelere demir uygulaması yapılarak organizmada demir birikimi sağlanabilmektedir. Demir uygulaması sonrasında organların hangi zaman aralıklarında etkilenmeye başladıkları demir uygulama şekline göre değişkenlik göstermektedir. Serumdaki demir değerleri incelendiğinde, oral demir uygulaması yapılan ratlarda ilk 1 saat içinde demirin artmaya başladığı, karaciğerde ise yaklaşık 4 saat içinde demir miktarının arttığı belirlenmiştir (49). İntraperitoneal demir dekstran verilmesi ile ratlarda 24 saat içinde gerek KC gerekse dalakta demir birikimi olduğu bildirilmektedir (50). Hemogloblin değerlerinde akut demir yüklemesi sonrasında sıklıkla değişim gözlenmemektedir (50,51).

Ratlarda dışarıdan demir verilmesiyle oluşan demir fazlalığının kemik iliği üzerindeki etkilerinin incelenebilmesi için eritrositlerin yaşam süreleri göz önüne alındığında en az 4 haftanın geçmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır (52,53). Çalışmamızda 2 haftalık i.p. demir uygulamasını takiben, demirin absorpsiyonu ve kemik iliği üzerindeki etkilerinin ortaya çıkabilmesi için 2 hafta süre beklenmiştir.

Çalışmamızda; kemik iliği hücrelerinin flow sitometri analizleri yapıldığında, total kemik iliği popülasyonu içinde eritroid seri hücre yüzdesinde demir fazlalığı ile

bir değişim olmadığı görülmektedir. Eritroid hücre popülasyonu fenotipik özelliklerine göre incelendiğinde geç dönem eritroid öncül hücre sayısında azalma olduğu buna karşılık erken dönem eritroid öncüllerin arttığı ortaya çıkmıştır. Literatürde çeşitli stres durumlarında, eritroid öncül hücrelerin fenotipik özelliklerinde benzer değişimler olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Kronik hastalık süreçlerinde kemik iliğindeki erken eritroid öncül hücrelerde artış olduğu ratlarda in vivo olarak gösterilmiştir (54). Stres sürecinin özellikle erken eritroid öncüllerde çoğalmaya neden olduğu saptanmıştır (55). Eř zamanlı olarak, geç dönem eritroid seri hücrelerinde ise apoptozu uyaran sinyallerin arttığı bildirilmektedir (56).

Eritroid  nc llerdeki hücre içi demir miktar artışının, ferritin sentezinin artırılması ve hücreye daha fazla demir girişini engellemek üzere TfR1 gen ekspresyonu miktarının azaltılması ile kompanse edilebildiği  ne sürülmektedir (57). Demir yüklenmesi yaptığımız ratlarda TfR1 gen ekspresyon miktarında azalma olduğu gözlenmiştir. Buna paralel olarak, erken eritroid öncüllerde eksprese olan ancak eritroid farklılaşma sürecinde ekspresyonu giderek azalan TfR2 geni incelendiğinde demir yüklenmesi durumunda TfR2 gen ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (58). TfR2 geni ekspresyon artışı erken eritroid öncül hücre yüzdesindeki artışla ilgili olabilir (59,60).

Eritroid  nc l hücrelerde bulunan bir diğer protein Epo reseptörüdür. Yapılan çalışmalarda erken öncül hücrelerde yüksek seviyede bulunan EpoR'nun eritroid hücrelerin olgunlaşması ile hücre yüzeyindeki miktarının azaldığı gösterilmiştir (61). EPO uyarısı ile erken öncül hücrelerde apoptoz azalmakta, hücre canlılığı artmakta ve eritroid hücreler çoğalmaktadır (62). Çalışmamızda demir verilen ratların K   rneklerinde EpoR gen ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Bu artış olasılıkla erken eritroid öncül hücre sayısındaki artışla ilişkilidir.

Demir verdiğimiz ratlarda, demir metabolizmasında rol alan ve karaciğerde eksprese olan genler incelendiğinde, gözlenen ekspresyonel değişimlerin demir yüklenmesini takiben subakut dönemde, akut dönemden kronik döneme geçiş sırasında, gözlenen değişimler olabileceği düşünülmüştür. Hepatositlerde TfR1 ve TfR2 gen ekspresyon seviyelerinde azalma saptanmıştır. Hepatosit hücre membranında TfR ile bağlanarak kompleks oluşturan ve hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan HFE gen ekspresyonunda demir fazlalığı sonrasında baskılanma olmuştur. Dolayısıyla HFE ile TfR1-2 reseptör protein komplekslerinin baskılanması, demir

yüklü olan ve depoları dolmuş olan hepatositlerde demir yükünü azaltma amaçlı bir mekanizmanın parçası olabilir.

Demir verilmesi sonrasında hepatositlerdeki demir fazlalığının etkileyeceği bir diğer hedef gen olan Hepsidin, çalışmamızda karaciğerdeki gen ekspresyonu ve serumdaki protein miktarları açısından incelenmiştir. Demir artışının akut dönemde Hepsidin sentezi üzerinde uyarıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Demir birikimine neden olan kronik hastalık süreçlerinde ise Hepsidin sentezi azalmaktadır. Akut demir artışıyla KC de Hepsidin sentezi artmakta, kronik dönemde ise KC Hepsidin sentezi azalmaktadır (25). Çalışmamızdaki KC Hepsidin gen ekspresyonunda hafif artış olmakla birlikte serum Hepsidin düzeyinin azalmakta olduğu saptanmıştır. Bu verilerin analizi sonucunda akut dönemde Hepsidin gen ekspresyonundaki artışın zamanla normal seviyelerine doğru geldiği anlaşılmaktadır. Bu verilerle çalışmamızın, demir yüklenmesinin, organizmada yarattığı değişikliklerin akut dönemden kronik döneme geçişi sırasında tespit edildiği düşünülmektedir. Bu dönem de subakut dönem olarak adlandırılmıştır.

Transfüzyonlara bağlı demir birikimi olan hastalarda da Hepsidin sentezinin baskılandığı ortaya çıkmıştır. Ancak bu hastalarda transfüzyon ihtiyacını doğuran neden genellikle inefektif eritropoez olduğu için organizmada demir ihtiyacı da rölatif artmış görünmektedir. Eritroblastlar için gerekli demir miktarını karşılamak üzere EPO sentezi uyarılmıştır ancak kronik süreçte demir ihtiyacı karşılanmış olmasına rağmen periferde eritrositlerin ihtiyacı karşılanamadığından gerek EPO gerekse diğer eritroblastik sinyallerin Hepsidin sentezi üzerindeki baskılayıcı etkisi sürekli olarak devam etmektedir.

HJV'nin proteolitik olarak parçalanmasıyla oluşan sHJV proteininin ise Hepsidin sentezi üzerindeki pozitif BMP sinyallerini baskılayabildiği öne sürülmektedir (63). Çalışmamızda sHJV miktarlarının demir verilen grupta azaldığı belirlenmiştir. Bu veriler azalmış Hepsidin sentezi ile uyumsuz görünmektedir. Bu sonucun anlaşılmasında hücre membranındaki HJV proteininin yıkılmasından sorumlu olan Matriptase-2 proteinin aktivitesi de incelenmelidir. Ayrıca demir verilmesini takiben zamana bağlı olarak HJV ve/veya Matriptase-2 gen ekspresyonlarının nasıl bir değişim gösterdiklerinin belirlenmesi yol gösterici olabilir (64).

Çalışmamızda elde edilen veriler bir bütün olarak incelendiğinde i.p. olarak demir verilen ratlarda hemoglobin ve hematokrit gibi eritroid parametrelerin

değişmediği görülmektedir. Demir artışına karşılık hemoglobin değerinin korunması amacıyla geç dönem eritroid hücre yüzdesi azalmış, buna karşılık erken dönem eritroid hücre yüzdesi artmıştır, bu durum kemik iliğinde apoptozun artmış olabileceğini düşündürmektedir. Demir yüklenmesi sonrasındaki subakut dönemde incelenmiş olan ratlarda sistemik demir yüküne yanıt olarak, hepatositlerde hepsidin sentezini azaltacak mekanizmalar uyarılmaya başlamıştır.

Gelecekte, bu kompleks mekanizmaların daha net anlaşılabilmesi açısından demir toksisitesinin hangi süreçte ne gibi değişimlere neden olduğunun daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla benzer olarak yapılacak çalışmaların süresinin daha uzun olup zamana bağlı olarak değişkenlerin incelenmesi ve mekanizmaların daha net anlaşılması açısından deneyde oluşturulan grup sayısının da artırılarak bir gruba şelasyon tedavisinin uygulanması ve şelasyon tedavisi sonrasında da demir ilişkili parametreler ve gen ekspresyonlarındaki değişimin araştırılması önerilir. Gerek eritropoezde gerekse karaciğerde gerçekleşen bu değişimlerin zamana bağlı olarak nasıl düzenlendiklerinin belirlenebilmesi, klinikte demir birikimi ile karakterize hastalıkların tanı ve tedavisi açısından yol gösterici olacaktır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada intraperitoneal olarak 6 gün boyunca 100 mg/kg/gün demir yüklemesi yaptığımız ratlarda, demir fazlalığının subakut/kronik dönem etkileri kemik iliği, karaciğer ve serumda bakılan demir ilişkili parametrelerle incelenmiştir.

Demir yüklemesinin serum demir ve ferritin düzeyinde belirgin artış oluşturduğu saptanmış ve ratların iç organlarında makroskopik olarak bronz renkte değişim olduğu gözlemlenmiştir. Serum demir ve ferritindeki artışın eritroid parametrelerden hemoglobin ve hematokritte belirgin farklılık yaratmadığı saptanmıştır. Bu sonuçla demir yüklenmesiyle belirgin eritroid uyarı olmadığını anlaşılmıştır.

Demir yüklenmesi ile kemik iliğinde hematopoietik hücreler içinde CD71(+) olan hücre yüzdesinin değişmediği gözlenmiştir. Ancak hücre yüzeyinde CD71 düşük (+) olan eritroid hücre yüzdesinde ve bu hücrelerin büyüklüklerinde artış, CD71 yüksek (+) hücre yüzdesinde azalma saptanmıştır.

Demir fazlalığının kemik iliğinde TfR1 gen ekspresyonunu düşürerek eritropoezde baskılanma yarattığı, ayrıca vücutta demir sensörü olarak görevli TfR2 gen ekspresyonunda artış yaparak demir depolarının doluluğunu göstermektedir. TfR2 geni vücuttaki demir yükünün gösterilmesi amacıyla kullanılabilir.

Kemik iliğinde EpoR gen ekspresyonunda artış saptanırken, KC’de EpoR gen ekspresyonunda değişim saptanmamıştır.

Karaciğerde TfR1 geni ve normal koşullarda KC’de daha fazla oranda bulunan TfR2 gen ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür. TfR2 gen ekspresyonundaki azalmanın daha belirgin olduğu saptanmıştır. Bu durum TfR2’nin demir miktarındaki değişime daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Sinyal ileti yollarında TfR1 ile birlikte görev yapan ve mutasyonunda ciddi derecede hemakromatozis görülen HFE gen ekspresyonunda KC’de istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptanmıştır. HFE proteini demir yüklenmesine neden olan durumlarda tanı ve ayırıcı tanıda kullanılabilir.

KC ‘de Hepsidin gen ekspresyonunda ise hafif artış olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu durum olasılıkla akut dönemde artan Hepsidin gen ekspresyonunun subakut dönemde azalmaya başlaması ile ilişkilidir.

Serumda Hepsidin gen ekspresyonunda azalma olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı saptanmazken, sHJV gen ekspresyonunda ise istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. sHJV düzeyi demir yüklenmesi ile giden hastalıklarda tanı ve ayırıcı tanıda ayrıca şelasyon tedavisine yanıtta kullanılabilir.

Tüm bu veriler sonucunda çalışmamızın sürecinin demir yüklemesinin eritropoeitik sistemde neden olduğu etkilerin subakut döneminde olduğu anlaşılmakta olup, bu kompleks mekanizmaların daha net anlaşılabilmesi açısından demir toksisitesinin hangi süreçte ne gibi değişimlere neden olduğunun daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla benzer olarak yapılacak çalışmaların süresinin daha uzun olup zamana bağlı olarak değişkenlerin incelenmesi ve mekanizmaların daha net anlaşılması açısından deneyde oluşturulan grup sayısının da arttırılarak bir gruba şelasyon tedavisinin uygulanması ve şelasyon tedavisi sonrasında da demir ilişkili parametreler ve gen ekspresyonlarındaki değişimin araştırılması önerilir.

7. ÖZET

RATLARDA DEMİR YÜKLEMESİNİN HEMATOPOİETİK SİSTEM, KEMİK İLİĞİ VE İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Eritrositlerin kemik iliğinde farklılaşması sürecinde, demirin bağırsaklardan emiliminde, hücrelere transportunda, kullanılmasında ve depolanmasında görevli olan proteinlerin ve ilişkili genlerin nasıl düzenlendiklerinin belirlenmesi konusunda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar çoğunlukla inefektif eritropoez ortamında araştırılmıştır. Eritropoezin normal olarak devam ettiği koşullarda, dışarıdan demir verilmesinin hematopoetik organlardaki etkileri sistematik olarak tümüyle açıklığa kavuşmamıştır. Demir uygulaması yapılmış ratlarda yürüteceğimiz çalışmamızda literatürdeki bu boşluğu doldurmak amaçlanmaktadır. Çalışmamızda kemik iliği, periferik dolaşım ve karaciğer dokularında, vücuttaki demir fazlalığını algılayan ve demir fazlalığından etkilenen sözkonusu hedef genlerde demir verilmesiyle gerçekleşecek ekspresyonel değişimlerin tanımlanması planlanmıştır. Elde edilecek verilerin demir birikimi ile seyreden hastalıklarda prognoz ve tedavi yanıtlarını takip etmede kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada Wistar-Albino cinsi 3 aylık 20 erkek rat kullanıldı. Ratlar kontrol (n=10) ve demir verilen grup (n=10) olarak ikiye ayrıldı. Deney grubundaki ratlara 100 mg / kg haftada 3 gün 2 hafta intraperitoneal olarak demir dekstran, kontrol grubuna ise aynı şekilde 5 ml SF verildikten sonraki 15 gün bekleme süresinden sonra ratlar aynı günde sakrifiye edilerek periferik kandan alınan örneklerden hemogram ve biyokimyasal parametreler incelendi. Kemik iliği örneklerinden ise; flow sitometri yöntemi ile eritroid öncüllerde oluşan değişimler ve PCR yöntemi ile gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. KC dokusundan ise PCR yöntemi ile gen ekspresyon ölçümleri yapılarak demir ilişkili genlerdeki ekspresyon değişimleri saptandı.

Serumda yapılan ölçümlerde demir ve ferritin değerlerinde belirgin artış olduğu ($p= 0.0001$) saptanmış olmasına rağmen hemoglobin ve hematokrit gibi eritroid parametrelerde farklılık olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). RDW değerinde ise; anlamlı artış saptanmıştır ($p= 0.001$). Kemik iliğinde flow sitometri ile yapılan analizlerde tüm hematopoietik hücreler içinde CD71(+) olan hücre yüzdesinin demir

uygulanan ratlarda değişmediği gözlenmiştir ($p>0.05$). Ancak CD71 ekspresyonu düşük (+) hücre yüzdesinin ve hücre büyüklüklerinin demir yüklenen grupta arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Kİ’de TfR1 gen ekspresyonunda azalma ($p<0.05$) ,EpoR ve TfR2 gen ekspresyonunda ise anlamlı artış ($p<0.05$) saptanmıştır. KC’deki gen ekspresyonlarına baktığımızda ise TfR1 ve TfR2 gen ekspresyonunda ayrıca HFE gen ekspresyonunda anlamlı azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Ayrıca KC’de Hepsidin gen ekspresyonunda anlamlı değişiklik saptanmamıştır ($p>0.05$) Çalışmamızda; periferik dolaşımdaki demir yüklenmesine karşılık hemoglobin ve hematokrit gibi eritroid parametrelerin korunduğu görülmektedir. Kemik iliğindeki eritropoetik hücrelerde demir girişini azaltmaya yönelik ekspresyon değişimleri gerçekleşmektedir. Kİ’de geç dönem eritroid hücre yüzdesi azalmış, buna karşılık erken dönem eritroid hücre yüzdesi artmıştır, bu durum artmış apoptozisin arttığını düşündürebilir. Demir verilmesi sonrasındaki subakut dönemde incelenmiş olan ratlarda sistemik demir yüküne yanıt olarak, hepatositlerde hepsidin sentezini azaltacak mekanizmalar uyarılmaya başlamıştır.

Sonuç olarak demir yüklenmesi yapılmış ratlarda periferde ve kemik iliğinde eritroid parametreler değişmemiş ve organizmadaki demir yükünü azaltacak hepatik yanıt oluşturulmuştur. Gelecekte, demir yüklenmesi sonrasında eritropoezde ve karaciğerde gerçekleşen bu değişimlerin zamana bağlı olarak nasıl düzenlendiklerinin belirlenebilmesi, klinikte demir fazlalığı ile karakterize hastalıkların tanı ve tedavisi açısından yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: Hemakromatoz, demir, hepsidin, rat, eritropoez.

8. ABSTRACT

THE EFFECT OF IRON OVERLOAD ON HEMATOPOETIC SYSTEM, BONE MARROW AND RELATED GENES IN RATS

Most of research has been done about structure of the proteins and genes responsible for metamorphosis process of erythrocytes in the bone marrow, absorption of iron in the intestines, transportation to the cells, its usage and storage. Most of this research was done in ineffective eritropoezis. In the conditions which eritropoezis continue normally, it wasn't entirely discovered what the systematic effects of external iron supplement on hematopoietic organs are. The aim of this research is to find out the information about iron overload on normal eritropoiesis. The target genes are in the bone marrow, peripheral circulation, liver tissue and they get effected by iron in the body. In our research, the goal is defining the expressional changes in these target genes caused by iron supplementation. The results of research is considered to be usable for prognosis and treatment in iron overload disease.

In our research, Wistar-Albino type, 12-16 weeks-old, 20 male rats were used. They were separated into two groups: The group that is supplemented with iron (n=10) and the control group (n=10). The rats in the test group has been given 100 mg/ kg by intraperitoneally iron dekstran 3 days a week for 2 weeks. Control group is given 5 ml SF. After 1 mounth, rats were sacrificed and peripheral blood samples were collected. The samples were examined for hemogram and biochemical parameters. On the other hand, the samples of the bone marrow were examined for changes in eritropoietic precursors using flow cytometri, and for gene expression analysis using PCR technique. Gene expression analyses were done through PCR technique in the liver tissue to determine the changes iron related gene expression.

Although results of iron and ferritin rates in serum were found to increase explicitly ($p= 0.0001$), there wasn't any difference in the eritroid paremetres like hemoglobin and hematocrit ($p>0.05$). But RDW rates were determined to raise significantly ($p= 0.001$). Analysis of the bone marrow using the flow cytometri showed that the percentage of CD71 (+) cells in the total eritroid cells didn't change for the iron overload rats ($p>0.05$). However, CD71 expression and cell sizes were

observed to increase in the CD71 low (+) cells ($p < 0.05$). In bone marrow, increase in EpoR gene expression ($p = 0.007$), decrease in TfR1 gene expression ($p = 0.003$) and increase in TfR2 gene expression ($p = 0.001$) were observed. In liver tissue gene expressions, in addition to TfR1, TfR2 and HFE gene expressions were also seen to decrease significantly ($p < 0.05$). Hepsidin gene expressions weren't observed to change significantly in the other analyses of liver tissue ($p > 0.05$)

In our research, erythroid parameters were not seen to be changed despite the iron overload. Expression changes were observed in erythropoietic cells in bone marrow for decreasing the entry of iron. Late period of cell percentage of bone marrow decreased due to compensate the iron increase in the peripheral erythroid indexes. On the contrary, the early period erythroid cell percentage increased. Mechanisms that will decrease hepcidin synthesis in hepatocytes started to be stimulated as a response to systematic iron accumulation in the rats that are examined in the subacute period after the iron accumulation.

In conclusion, erythroid parameters in peripheral and bone marrow of the iron overload rats were not changed and hepatic response to decrease iron load in organism is created. In the future, designating these changes after iron overload in the erythropoiesis and liver with time- course study, will be important for diagnosis and treatment of the diseases characterized by iron accumulation.

Key word: Hemochromatosis, iron, hepcidin, rat, erythropoiesis.

9. KAYNAKLAR

1. Brittenham G. Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. In Hematology, Basic Principles and Practice 3rd Ed. In: Hoffman R, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, Mcglave P (eds). New York Copyright©2000 Churchill Livingstone 2000; 397-428.
2. Smith LH. Overview of hemochromatosis. West J Med 1990; 153: 296-308.
3. Sharma N, Butterworth J, Cooper BT, Tselepis C, Iqbal TH. The emerging role of the liver in iron metabolism. Am J Gastroenterol 2005; 100: 201-6.
4. Beutler E. Disorders of iron metabolism. Williams Hematology, 7th Ed. In: Lichman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligson U, Kaushansky K, Prchal JT (eds). New York: McGraw-Hill 2006; 511-53.
5. Crichton RR, Wilmet S, Legsyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. J Inorg Biochem 2002; 91: 9-18.
6. Umbreit J. Iron deficiency: a concise review. Am J Hematol 2005; 78: 225-31.
7. Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Heparin--central regulator of iron metabolism. Eur J Haematol 2007; 78: 1-10.
8. Andrews NC, Schmit PJ. Iron homeostasis. Annu Rev Physiol 2007; 69: 69-85.
9. Frazer DM, Vulpe CD. Cloning and gastrointestinal expression of rat hephaestin: relationship to other iron transport proteins Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 281: 931-9.
10. Crichton R. Inorganic biochemistry of iron metabolism. From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences 2nd Ed. John Wiley & Sons Ltd 2001.
11. Andrews NC. Iron Hemostasis: Insights from genetics and animal models. Nat Gene Rev 2000; 1: 208-21
12. Ganz T. Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. Hematology Am Soc 2006; 507: 29-35.
13. Kawabata H, Fleming ER. Expression of hepcidin is down-regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis Blood 2005; 105: 376-81.
14. Gross CN, Irrinki A, Feder JN, Enns CA, Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. J Biol Chem 1998; 273: 22068-74.

15. Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2492.
16. Piperno A, Girelli D, Nemeth E. Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood* 2007; 110: 4096.
17. Vyoral D, Petrak J. Hepcidin: a direct link between iron metabolism and immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1768-73.
18. Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 93-100.
19. Hugman A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. *Clin Lab Haem* 2006; 28: 75–83.
20. Means RT JR. Hepcidin and anaemia. *Blood Rev* 2004; 18: 219-25.
21. Nelson EJ, Kowdley VK. Non-HFE hemochromatosis: Genetics, Pathogenesis and Clinical Management. *Current Gastroenterol Reports* 2005; 7: 71–80.
22. Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1763: 700–10.
23. Darshan D, Anderson GJ. Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* 2009; 22(1): 77-87.
24. Nemeth E. Targeting the Hepcidin-Ferroportin Axis in the Diagnosis and Treatment of Anemias. *Adv Hematol* 2010; 750643.
25. Huang H, Constante M, Layoun A, Santos MM. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood* 2009; 113: 3593-9.
26. Arndt S, Maegdefrau U, Dorn C, Schardt K, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. Iron-induced expression of bone morphogenic protein 6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression in vivo. *Gastroenterology* 2010; 138(1): 372-82.
27. Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, Xie JX, Jung JU, Liu Y, Xi CX, Mei L, Xiong WC. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood* 2010; 115: 3136-45.
28. Wenjie Chen, Franklin W. Huang, Tomasa Barrientos de Renshaw, Nancy C. Andrews. Skeletal muscle hemojuvelin is dispensable for systemic iron homeostasis. *Blood* 2011; 117: 6319-25.

29. Yin Xia, Jodie L. Babitt, Yisrael Sidis, Raymond T. Chung and Herbert Y. Lin. Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood* 2008; 111: 5195-204.
30. Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. A Mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 2187–91.
31. Lin L, Goldberg YP, and Ganz T. *Blood* 2005; 106: 2884–9.
32. Zhang AS, Anderson SA, Meyers KR, Hernandez C, Eisenstein RS, Enns CA. Evidence that inhibition of hemojuvelin shedding in response to iron is mediated through neogenin. *J Biol Chem* 2007; 282(17): 12547-56.
33. Ramsay AJ, Reid JC, Velasco G, Quigley JP, Hooper JD. The type II transmembrane serine protease matriptase-2 –identification, structural features, enzymology, expression pattern and potential roles. *Front Biosci* 2008; 13: 569–79.
34. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 2008; 8: 502–11.
35. Lakhal S, Talbot NP, Crosby A, Stoeckler C, Townsend AR, Robbins PA, et al. Regulation of growth differentiation factor 15 expression by intracellular iron. *Blood* 2009; 113: 1555-63.
36. Broudy VC, Lin N, Brice M. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells *Blood* 1991; 77: 2583-90.
37. Jelkmann W, Metzen E. Erythropoietin in the control of red cell production. *Ann Anat* 1996; 178: 391–403.
38. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995; 83: 59–67.
39. Tanno T, Miller JL. Iron Loading and Overloading due to Ineffective Erythropoiesis. *Adv Hematol* 2010; 358283.
40. Franchini M. Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Am J Hematol* 2006; 81(3): 202-9.
41. Mayr R, Janecke AR, Schranz M, Griffiths WJ, Vogel W, Pietrangeli A, Zoller H. Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *J Hepatol* 2010; 53(5): 941-9.
42. Siah C, Ombiga J, Adams L, Olynyk J. Normal Iron Metabolism and the Pathophysiology of Iron Overload Disorders. *Clin Biochem Rev* 2006; 27(1): 5–16.

43. Jacolot S, Yang Y, Paitry P, Férec C, Mura C. Iron metabolism in macrophages from HFE hemochromatosis patients. *Mol Genet Metab* 2010; 101(2-3): 258-67.
44. Rivella S. Ineffective erythropoiesis and thalassemias. *Curr Opin Hematol* 2009; 16(3): 187-94.
45. McLintock LA, Fitzsimons EJ. Erythroblast iron metabolism in sideroblastic and sideropenic states. *Hematology* 2002; 7(3): 189-95.
46. Fargion S, Valenti L, Fracanzani AL. Beyond hereditary hemochromatosis: New insights into the relationship between iron overload and chronic liver diseases. *Dig Liver Dis* 2010.
47. Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Mysliwiec M. Hepcidin, iron status, and renal function in chronic renal failure, kidney transplantation, and hemodialysis. *Am J Hematol* 2006; 81(11): 832-7.
48. Leitch HA. Improving clinical outcome in patients with myelodysplastic syndrome and iron overload using iron chelation therapy, *Leukemia Research* 2007; 31S3: 7-9.
49. Whittaker P, Ali SF, Imam SZ, Dunkel VC. Acute toxicity of carbonyl iron and sodium iron EDTA compared with ferrous sulfate in young rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 36(3): 280-6.
50. Seymen HO, Özçelik D, Gülyavaş T, Mengi M, Seymen P, Yiğit G. Effect of iron overloading on the tissue levels of iron. *İstanbul U Cerrahpaşa J Med* 1999; 30: 207-13.
51. Fleming RE, Ahmann JR, Kawabata H. Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(16): 10653-8. Epub 2002 Jul 19.
52. Derelanko MJ. Determination of erythrocyte life span in F-344, Wistar, and Sprague-Dawley rats using a modification of the [³H]diisopropylfluoro-phosphate ([³H]DFP) method. *Fundam Appl Toxicol* 1987; 9: 271-6.
53. Vernon E, Walker, John P. MacNeela Molecular Dosimetry of Ethylene Oxide: Formation and Persistence of *N*-(2-Hydroxyethyl)valine in Hemoglobin following Repeated Exposures of Rats and Mice *Cancer Res* 1992; 52: 4320-7.
54. Prince OD, Langdon JM, Layman AJ, Prince IC, Sabogal M, Mak HH, et al. Late stage erythroid precursor production is impaired in mice with chronic inflammation. *Haematologica* 2012.
55. Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2007; 14(3): 215-24.

56. Fang J, Menon M, Zhang D, Torbett B, Oxburgh L, Tschan M, et al. Attenuation of EPO-dependent erythroblast formation by death-associated protein kinase-2. *Blood* 2008; 112(3): 886-90.
57. Schranzhofer M, Schiffrer M, Cabrera JA, Kopp S, Chiba P, Beug H, Müllner EW. Remodeling the regulation of iron metabolism during erythroid differentiation to ensure efficient heme biosynthesis. *Blood* 2006; 107(10): 4159-67.
58. Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2-a supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275: 16618-25.
59. Kawabata H, Germain RS. Regulation of expression of murine transferrin receptor 2 *Blood* 2001 98: 1949-54.
60. Chen TT, Yuan LX, Pan LL. TfR2 mRNA expression in bone marrow mononuclear cells of children with hyperplastic anemia and its implications *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2011; 19(2): 439-43.
61. Broudy VC, Lin N, Brice M. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 1991; 77: 2583-90.
62. Jelkmann W, Metzen E. Erythropoietin in the control of red cell production. *Ann Anat* 1996; 178: 391–403.
63. Nili M, Shinde U, Rotwein P. Soluble repulsive guidance molecule c/hemojuvelin is a broad spectrum bone morphogenetic protein (BMP) antagonist and inhibits both BMP2- and BMP6-mediated signaling and gene expression. *J Biol Chem* 2010; 285(32): 24783-92.
64. Zhang AS, Anderson SA, Wang J, Yang F, DeMaster K, Ahmed R, et al. Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood* 2011; 117(5): 1687-99.