

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ

**Sıçanlarda oluşturulan deneysel miyokardit modelinde obestatinin etkisi**  
**Proje No: TDA-2014-5062**

Proje Türü: Dış Kaynaklı Projeler İçin Acil İhtiyaç Projesi

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**  
Doç Dr Ali BAYKAN  
Birimi/Bölümü  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı Çocuk Kardiyoloji Bölümü

Araştırmacının Adı Soyadı  
Birimi/Bölümü  
Özge Pamukçu  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı Çocuk Kardiyoloji Bölümü

Mart 2015  
KAYSERİ



## İÇİNDEKİLER

|                  | Sayfa No |
|------------------|----------|
| ÖZET             | 4        |
| ABSTRACT         | 5        |
| 1. GİRİŞ         | 7        |
| 2.MATERYAL METOD | 8        |
| 3. BULGULAR      | 11       |
| 4. TARTIŞMA      | 18       |
| 5.KAYNAKLAR      | 21       |

**Özet:****Amaç:**

Miyokardit, miyokardiyumun inflamasyonu ve nekrozu ile karakterize bir hastalıktır. Hastalığın gerçek insidansı bilinmemekle birlikte çocukluk çağında, özellikle de yenidoğan döneminde edinsel kalp hastalıkları arasında çok yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Etkili bir tedavisi mevcut değildir.

Enerji metabolizmasında yer alan, gıda alımının düzenlenmesinde ghreline zıt etkiler gösteren obestatinin inflamasyon üzerindeki etkileri konusunda literatürde yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur. Obestatin otoimmün regülatuar ve antiinflamatuvar etkinliği olduğu bilinen endojen bir peptiddir. Bu çalışmada deneysel otoimmün miyokardit modelinde obestatinin anti-inflamatuvar etkisinin gösterilmesi amaçlanmaktadır.

**Materyal Metod:**

Lewis cinsi sıçanlara 0 ve 7.gün subkütan saflaştırılmış domuz kardiyak miyosini verilerek 21.gün sonunda otoimmün miyokardit oluşturulmuştur. Intraperitoneal obestatin tedavisi 0.gün başlanıp 21 gün devam edilmiştir. Kontrol grubuna miyokardit grubundaki gibi eşit dozlarda ve aynı zamanlarda Freund's adjuvan ve saline verilmiştir. Sıçanların vücut ve kalp ağırlıkları, ekokardiyografik, elektrokardiyografik incelemeleri, histopatolojik değişiklikleri değerlendirilmiş, nötrofil aktivasyonu, lipid peroksidasyonu, inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin düzeyleri serumda ölçülmüştür.

**Bulgular:**

Obestatin miyokarditin klinik, ekokardiyografik ve histopatolojik etkileri üzerinde anlamlı düzelme sağlamıştır. Obestatinin bu etkisi glutathione sentezinde artış, proinflamatuvar olan sitokinlerde (IL-1 $\beta$ , IL6) azalma, anti-inflamatuvar sitokin olan TGF  $\beta$ 'da artışla karakterizedir.

**Sonuç:**

Bu çalışma obestatinin deneysel miyokardit modeli üzerinde anti-inflamatuvar etkisini göstermekte altta yatan mekanizması bilinmeyen miyokardit hastalığının tedavisi için umut vadetmektedir.

**Anahtar Kelimeler: sıçan, obestatin, miyokardit, otoimmün**

**Abstract:****Background and aim:**

Obestatin is a popular endogeneous peptide, known to have autoimmune regulatory effect on energy metabolism and gastrointestinal system. The studies regarding the anti-inflammatory effect of obestatin are limited in number. In this study we aimed to show anti-inflammatory effect of obestatin in experimental rat autoimmune myocarditis model.

**Material and Methods:**

Experimental autoimmune myocarditis was induced in Lewis rats by immunization subcutaneously twice at a 7-day interval with porcine cardiac myosin in an equal volume of complete Freund's adjuvant supplemented with *Mycobacterium tuberculosis*.

Intraperitoneal pretreatment with obestatin(50µg/kg) was started before the induction of myocarditis, and continued for 3 weeks. The severity of myocarditis was evidenced by clinical, echocardiographic and histological findings. In addition by-products of neutrophil activation, lipid peroxidation, inflammatory and anti-inflammatory cytokines were measured in serum.

**Results:**

Obestatin significantly ameliorated clinical and histopathological severity of autoimmune myocarditis. Therapeutic effect of obestatin in the myocarditis was associated with reduced lipid peroxidation ,suppression of PMNL infiltration and enhancement of glutathione synthesis [malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), glutathion peroxidase (GSH) activities], inhibition of serum inflammatory(IL-1β, IL 6, TNF?), and activation of anti-inflammatory cytokines (TGFβ, IL-10). Histopathologically; there was obvious cavity dilatation and a increase in wall thickness in left ventricle, widespread lymphocytic and histocytic infiltrate (arrow) is associated with myocyte damage Severe infiltration of relatively large mononuclear cells (solid arrow)was observed myocardium. Large areas of necrosis and myofiber degeneration were present(Figure1) in myocarditis. These histopathological changes were all shown to be decreased in obestatin treated rats. Minimal focal inflammatory lesion is shown macroscopicallyin Figure 2. There was mild dilatation

and a in wall minimal thickness in left ventricle. Myocardial inflammatory infiltration (arrow) was also seen but decreased in comparison to myocarditis group (figure 2).

**Conclusion:**

This study demonstrated novel anti-inflammatory effect of obestatin in an experimental model of autoimmune myocarditis. Consequently, obestatin administration may represent a promising therapeutic approach for myocarditis and so for the dilated cardiomyopathy in the future.

**Keywords: rats, myocarditis, obestatin, autoimmune**

**\*\*Bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**Giriş:**

Miyokardit, miyokardiyumun inflamasyonu ve nekrozu ile (altta yatan bir koroner arter hastalığı olmadan) karakterizedir (1). Klinik bulguların asemptomatik olgulardan, dolaşımsal kollaps ve ani ölüm izlenen hastalara kadar çok geniş bir yelpazede dağılım göstermesi nedeniyle miyokarditin gerçek insidansı bilinmemektedir. Ani kardiyak ölüm gelişen genç erişkinlerde yapılan postmortem çalışmalarda miyokardit sıklığı % 8.6-12 arasında bildirilmiştir (2,3). Ayrıca geniş serileri içeren prospektif çalışmalarda dilate kardiyomiyopatili hastaların % 9'unda neden olarak miyokardit saptanmıştır (4). Miyokardit, çocukluk çağında, özellikle de yenidoğan döneminde ve genç erişkinlerde edinsel kalp hastalıkları arasında çok yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir (3,5).

Çocukluk çağında yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olan miyokardit patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Elimizdeki bilgiler etyolojiye bakılmaksızın tüm miyokarditlerde karmaşık otoimmün mekanizmaların fizyopatolojinin esasını oluşturduğunu göstermektedir (6). Viral miyokarditlerde bile virusun varlığı miyokardit ve kronik kardiyomiyopati gelişmesinde tek başına belirleyici faktör değildir. Hastalığın seyrini ve kalp yetmezliğine ilerlemesini daha çok kalp spesifik otoimmünitenin varlığı belirler (7). Dolayısıyla otoimmünite ve burada rol alan mediatörlerin incelenmesi hastalığın tedavisinde önemli bir yere sahip olacaktır.

Obestatin ghrelin prohormonunun proteolitik bölünmesi ile sentezlenen bir hormondur. İnsan preproghrelin geni 3p25-26 kromozomu üzerinde yerleşmiştir (8). Aynı genden ve aynı proteinden, posttranslasyonel modifikasyonla üretilen ve belirlenmiş farklı reseptörler üzerinden etki eden obestatin ve ghrelinin, enerji dengesi ve gastrointestinal motilite üzerine birbirine zıt etkiler gösterdikleri kabul edilmektedir (9). Enerji metabolizmasında yer alan, gıda alımının düzenlenmesinde ghreline zıt etkiler gösteren obestatinin inflamasyon üzerindeki etkileri konusunda literatürde yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur (10). Miyokardit üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışma ise literatürde mevcut değildir. Bu çalışmada deneysel otoimmün miyokardit modelinde obestatinin anti-inflamatuar etkisinin gösterilmesi amaçlanmaktadır

**Materyal Metod:****Hayvanlar:**

Çalışmamızda, 7 hafta yaşında, 200–250 gr ağırlığında, Charles River Japan Inc. (Atsugi, Kanagawa, Japan) şirketinden satın alınan dişi Lewis cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar, ısı (  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), nem (%65-70) ve ışık kontrolü sağlanmış ortamda, standart sıçan yemi ile beslendiler ve su alımları kısıtlanmadı. Deney süresince ışık düzeni 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Her biri 6 sıçandan meydana gelen toplam 4 grup oluşturuldu: Grup 1: Miyokardit+Saline, Grup 2 Kontrol+Saline, Grup 3: Miyokardit +Obestatin, Grup 4: Kontrol+Obestatin.

Deneysel miyokardit daha önceki çalışmalarda anlatıldığı gibi (11-13) saflaştırılmış domuz kardiyak miyosini(Sigma Chemical Co, St Louis, MO,USA) (10mg/ml) 0.01M potasyum fosfor bufferında eritip eşit miktarda Freund's adjuvant (Sigma Chemical Co) ile karıştırarak bir emülsiyon hazırlanarak; miyokardit grubundaki sıçanlara 0-7. günlerde subkütan olarak bu emülsiyondan 0.2 ml enjeksiyon yapıldı. Kontrol grubuna miyokardit grubundaki gibi eşit dozlarda ve aynı zamanlarda (0. ve 7. Gün) Freund's adjuvan ve potasyum fosfat buffer saline verildi. Miyokardit ve kontrol gruplarından obestatin alan gruplara 0.günden başlayarak 21 gün boyunca 50mcg/kg/gün intraperitoneal obestatin enjeksiyonu yapıldı.

**Elektrokardiyografi ve Ekokardiyografi**

Deneysel periyodun başlangıcında ve sonunda, elektrokardiyografik ve ekokardiyografik incelemeler yapmak için hayvanlar ketamin (50 mg/kg, i.p.) ve ksilazin (10 mg/kg, i.p.) kombinasyonu ile anestezi edildi. Hayvanlar sırt üstü yatırılarak, Power Lab kayıt cihazı (AD Instruments, PowerLab T26, Australia) ile standart II. derivasyonlar kaydedildi ve toplanan veriler Lab Chart 7 Pro yazılımı ile analiz edildi (AD Instruments, PowerLab). Düzeltilmiş QT değerleri Bazett formülüne göre hesaplandı.

EKG kaydını takiben, hayvanların güğüs bölgesi traş edildi ve sırt üstü veya sol tarafına yatık pozisyonda ultrasonografi ve 11.5 MHz' lik transdüser kullanılarak M mod traseleri ve 2 boyutlu ekokardiyografi görüntüleri elde edildi. Sol ventrikül boyut ve fonksiyonlarını belirlemek için parasternal kısa eksen kullanıldı.

## **Histopatoloji:**

### **1.1 Makroskopik inceleme:**

Sıçanlara ilk enjeksiyondan sonraki 21. gün ötenazi yapıldı. Kalpleri çıkarılarak, alınan kalp dokuları makroskopik olarak değerlendirildi.

Makroskopik skrolama: 0(normal görünüm), 1(fokal renk değişikliği olan alan), 2(kalbin 1/3ünü geçmeyen multipl veya diffüz renk değişikliği olan alan), 3(kalbin 2/3ünü geçmeyen diffüz renk değişikliği olan alan), 4(kalbin 2/3ünü geçen diffüz renk değişikliği olan alan); Perikardiyal efüzyon ise: 0(yok), 1(hafif), ve 2(masif) olarak puanlandı (14-17).

### **1.2 Mikroskopik inceleme:**

Makroskopik inceleme sonrası kalp dokusu %10luk formolde fikse edilip parafine gömüldü. Sol ventrikül papiler kas düzeyinden transverse kesitler alındı. Sol ventrikül hipertrofisi, Image J. Software (1.48v, Wayne Rasband National Institutes of Health,USA. Java 1.6.0\_20(32-bit))kullanılarak sol ventrikül duvarından 20 farklı bölgedeki kalınlık ölçülerek değerlendirildi. Kesitler Hematoksilen Eosin ve Masson's trichrome boyası ile boyandı (18). Mikroskopik skorlandı: 0 (normal), 1(transvers kesitin %1ini geçmeyen lezyon), 2(%10u geçmeyen), 3(%50yi geçmeyen), 4 (lezyon%50yi geçen defekt).

## **Biyokimyasal Analiz:**

Sıçanlar sakrifiye edildiğinde inferior vena kavalardan 2 cc kan alınarak 2000g de 10 dk 4°Cde santrifüjlererek plazma elde edildi. Bu plazma steril pipetlerle alınarak çalışma anına kadar -80°Cde saklandı.

### **Serum Troponin Düzeyleri:**

Kardiyak Troponin-I (cTnI)düzeyi; normal üst limiti 0.3 ng/mL olan ticari bir enzim immünassay kiti (DRG International Inc; USA) ile yapımcı firmanın komutları doğrultusunda değerlendirilmiştir.

### **Serum Sitokin Analizi**

IL 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,TGF- $\beta$ , IL-6, ve IL-10 sitokinlerinin plazma konsantrasyonları pikogram/mililitre olarak ticari bir enzim immünassay kiti (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) ile yapımcı firmanın direktifleri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

**Miyeloperoksidaz Aktivitesi:**

Miyeloperoksidaz (MPO) polimorfonükleer lökositlerin(PMNL) azurofilik granüllerinde bulunan bir enzimdir. Serum MPO düzeyi inflame dokularda PMNL birikimini tahmin etmede yardımcıdır ve düzeyi PMNL sayısı ile koreledir. Serum MPO aktivitesi Klebanoff ve ark.(19) tanımladığı bir yöntemle çalışıldı ve U/L olarak ifade edildi.

**Serum Malondialdehid(MDA) ve Glutatyon(GSH) Aktivitesi:**

MDA düzeyi daha önceden 1979'da Ohkawa ve ark. (20) tanımladığı bir yöntemle ölçüldü. MDA tiobarbitürik asitle reaksiyona girerek maksimum 540nm dalgaboyu absorbansı olan pembe kromojen bileşiği oluşturmaktadır. Plazma MDA konsantrasyonu mikromol/ litre ( $\mu\text{mol/L}$ ) olarak ifade edildi.

Glutatyon antioksidan bir tripeptid olup en önemli görevi hücrel komponentleri; serbest radikal, peroksit gibi reaktif oksijen maddelerin hasarından koruyarak hücrel protein ve lipidleri fonksiyonel hallerinde idamesini sağlamaktır (21). Glutatyon (GSH) aktivitesi RANSOD ve RANSEL adında (Randox Company Ltd., UK) ticari kitleriyle ölçüldü. Glutatyon ölçümünde benzer bir yöntem de daha önce Momen-Beitollahi ve ark.(22) tarafından tanımlanmıştır.

**İstatiksel Analiz**

Sonuçlar ortalama $\pm$ SD şeklinde ifade edildi. Datanın karşılaştırılması Student's t test ile yapıldı.

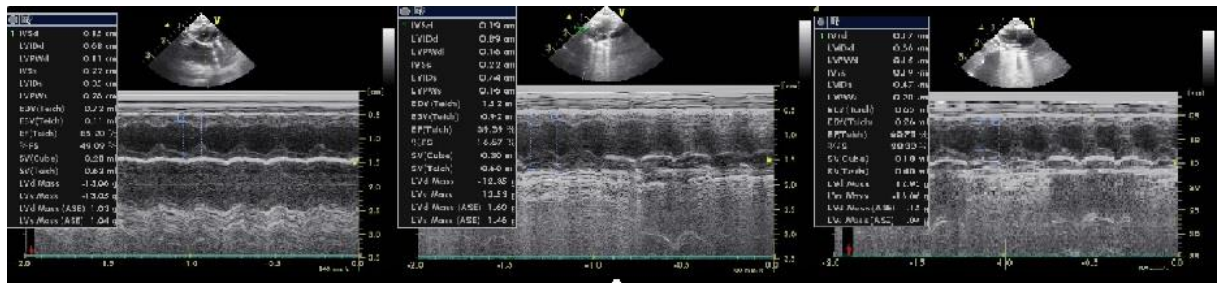
$p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Shapiro–Wilk testi verilerin normalitesini değerlendirmek için kullanıldı. Normal dağılmayan veriler için Student Newman-Keuls testi ve Kruskal Wallis kullanılırken, normal dağılan veriler için Wilcoxon testi kullanıldı.

## Bulgular:

### Ekokardiyografik İnceleme Bulguları:

M mod ekokardiyografik değerlendirme ile sıçanların 14. Gün sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (EF1) ve kısalma fraksiyonu (FS1) ve 21.gün sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (EF2) ve kısalma fraksiyonu (FS2) ölçüldü. Miyokardit grubunda 14.gün EF1 ve FS1 de anlamlı azalma görülmezken 21. Gün EF2 ve FS2 de anlamlı azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ ). Ayrıca obestatin tedavisi almış olan miyokardit grubunda miyokardit grubuna kıyasla EF ve FS değerleri anlamlı olarak arttığı gösterildi ( $p<0.001$ ) (Resim 1)



**Resim 1:** Ekokardiyografik bulgular: Kontrol, miyokardit ve obestatinle tedavi edilen miyokardit grubundan sıçanların temsili M-mode ekokardiyografik inceleme sonuçları gösterilmiştir. Tedavi edilmemiş miyokardit grubunda sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu(LVEF) 21. Günde belirgin azalma gösterirken, obestatinle tedavi edilen grupta ise kontrol grubuna göre EF düşerken tedavi edilmeyenlere oranla artış görülmüştür.

### Elektrokardiyografik İnceleme Bulguları:

Elektrokardiyografik incelemede: kalp hızı, PR intervalı, P süresi, QRS süresi, QT intervalı, QTC, T piki, P amplitüdü, R amplitüdü, ST yüksekliği, T amplitüdü değerlendirildi. Miyokardit grubunda kontrol grubuna göre artış saptanırken gruplar arası istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Diğer parametreler için de anlamlı farklılık saptanmamıştır.

### Otoimmün Miyokarditin Klinik ve Histopatolojik Etkileri

Intraperitoneal domuz kardiyak miyozini yapılan sıçanlarda otoimmün miyokardit gelişti ve anlamlı olmayan kilo kaybı görüldü. Obestatin enjeksiyonu, miyokarditi tedavi ederek buna bağlı olan kilo kaybını düzelttiği görüldü. Kalp ağırlığı ise miyokardit grubunda hipertrofiye bağlı anlamlı olarak arttı. Tablo 1de kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranı gösterilmiştir.

Tablo 1:

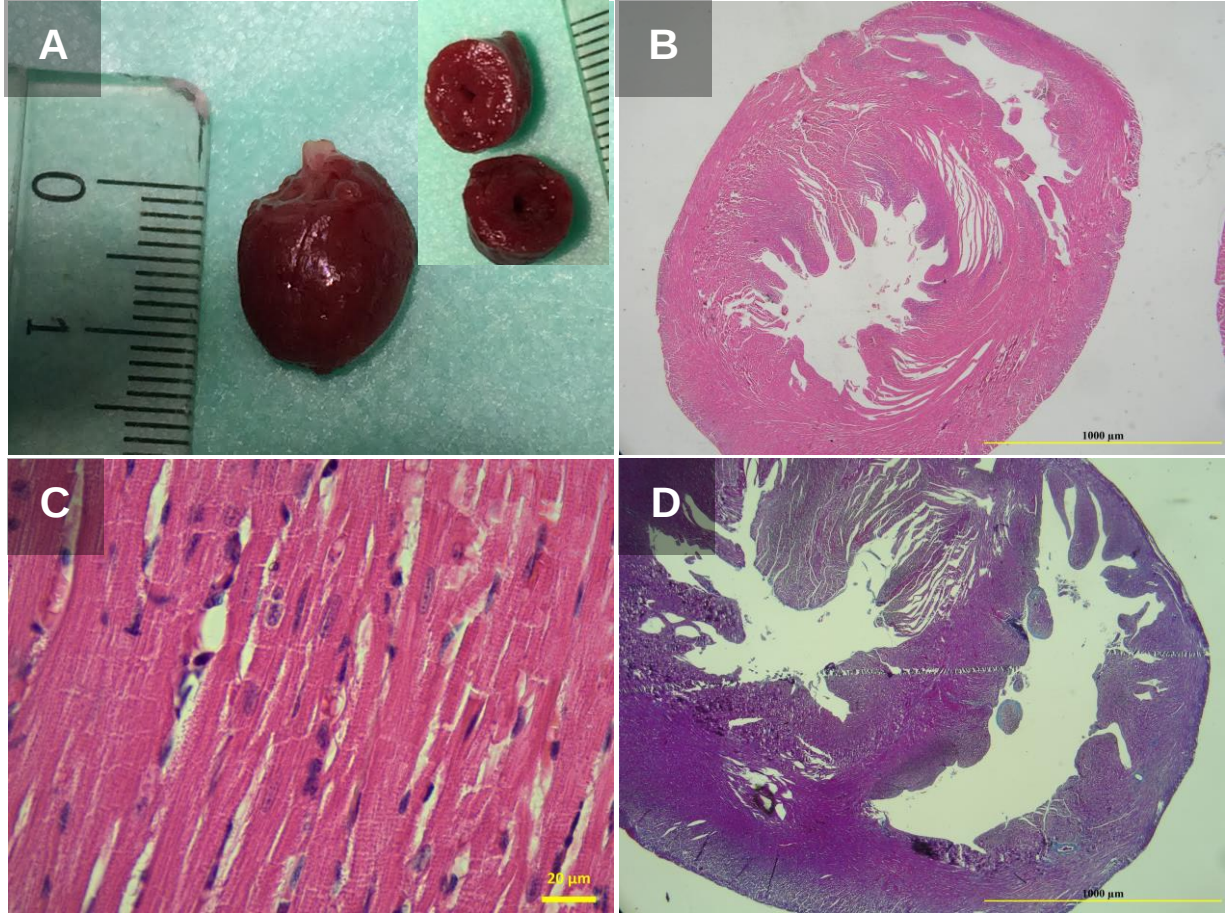
|                                         | 21.gün     |                          |                          |
|-----------------------------------------|------------|--------------------------|--------------------------|
|                                         | Kontrol    | Miyokardit               | Miyokardit+obestatin     |
| <b>Kalp Ağırlığı(gr)</b>                | 0.77±0.04  | 0.97±0.07 <sup>##</sup>  | 0.815±0.03 <sup>**</sup> |
| <b>Vücut Ağırlığı (gr)</b>              | 211±10     | 196±8 <sup>##</sup>      | 205±5                    |
| <b>Kalp ağırlığı/vücut ağırlığı (%)</b> | 0.36±0.015 | 0.49±0.012 <sup>##</sup> | 0.39±0.009 <sup>**</sup> |

### Makroskopik Derecelendirme:

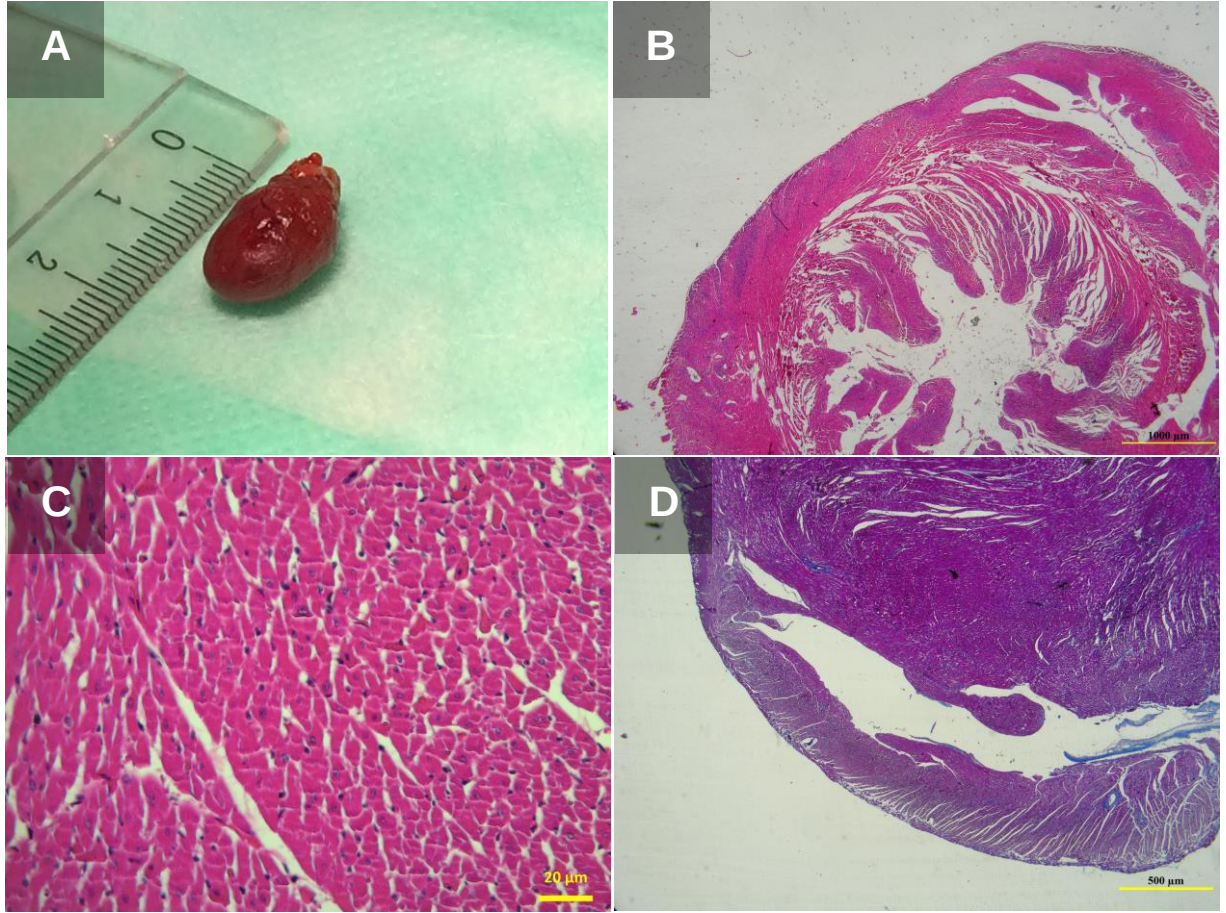
Sıçanlar 21. gün sakrifiye edildikten sonra kalpleri çıkarılarak makroskopik inceleme yapıldı. Miyokardit grubunda tedavi almamış sıçanların kalplerinde ciddi, yaygın renk değişikliği ve endokard yüzeyinde miliyer odaklar görüldü. Perikardiyal efüzyon izlenmedi (Resim 3,4). Miyokardit grubundaki hayvanlara makroskopik derecelendirme yapıldığında kontrol grubuna göre anlamlılık saptanmadı. Benzer şekilde obestatin tedavisi alan grupta tedavi almayanlara göre anlamlı azalma görülmeydi.

### Mikroskopik Derecelendirme:

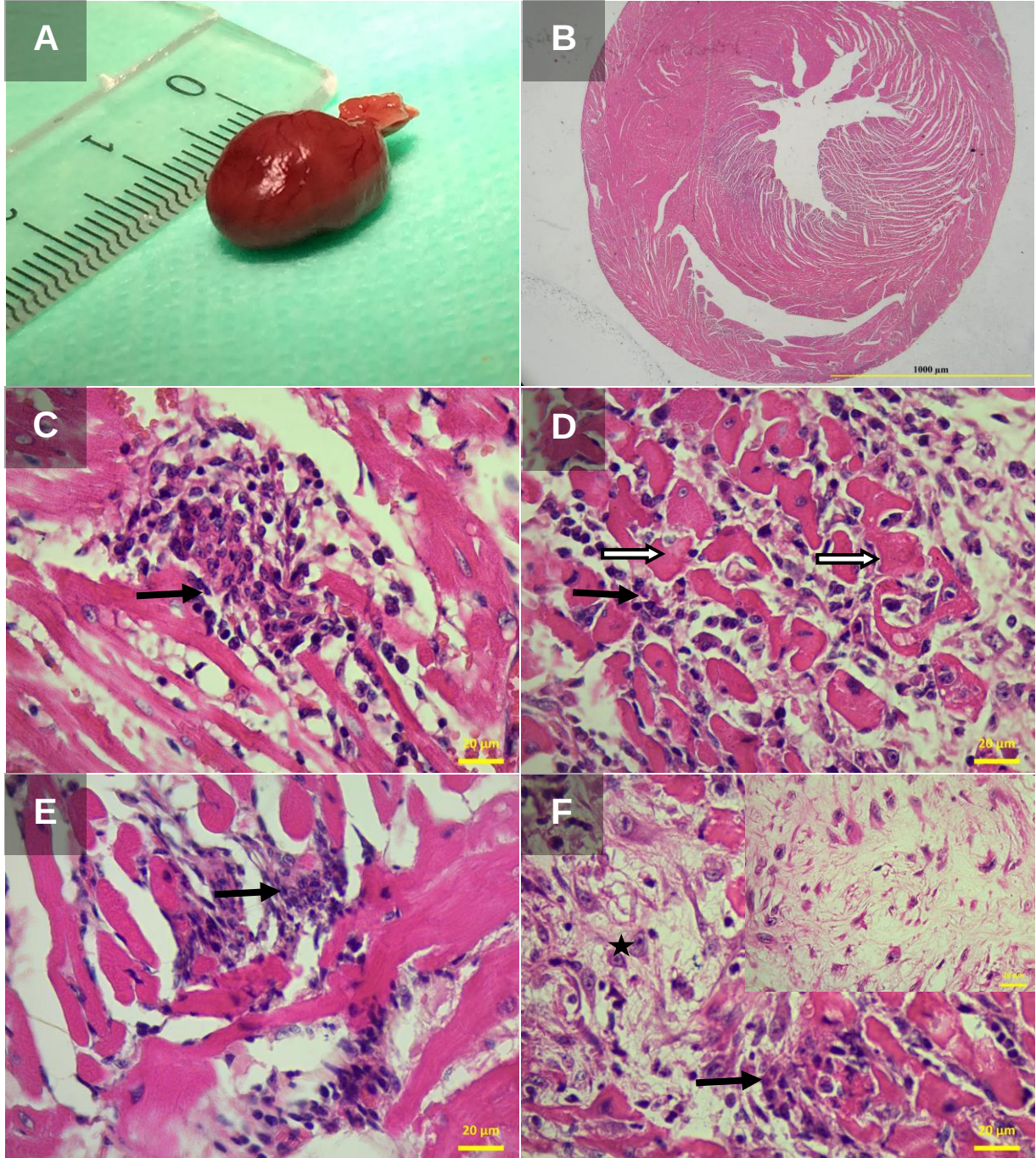
Kontrol grubundaki sıçanlarda (obestatin tedavisi alan ve almayanlarda) herhangi bir kardiyak patolojiye rastlanılmadı (Resim 2,3). Miyokardit grubunda ise nekrotik miyokardiyal lifler, mononükleer hücreler gibi miyositlerde yaygın inflamatuvar değişiklikler (Resim 4) gözlemlendi. Yirmibir gün boyunca 50 µg/kg dozundan obestatin tedavisi sonrası inflamasyonun şiddetinde belirgin azalma saptandı (Resim 5). Obestatin tedavisi alan sıçanlarda inflamatuvar hücrelerin sayısında azalma saptandı.



**Resim 2: Sağlam kalp dokusundan temsili resim (grade 0)** A) Makroskopik görünüm-içerden B-D kesitler: Sol ventrikül ortasından alınan histopatolojik kesitler sırasıyla Hematoksilen Eozin, Masson's trikrom boyası ile boyanmış. C) Normal kalp dokusunun histopatolojisi (grade 0).



**Resim 3.** Kontrol obestatin grubuna ait temsili resimler A) Makroskopik görüntü B-D) Sol ventrikül, sağ ventrikülden alınan spesimenler: dilatasyon ya da hipertrofiye rastlanılmadı. Sırasıyla Hemotoksilen eozin, Masson's Trikrom boyası C) Hemotoksilen Eozinle boyanmış düzgün kalp dokusu



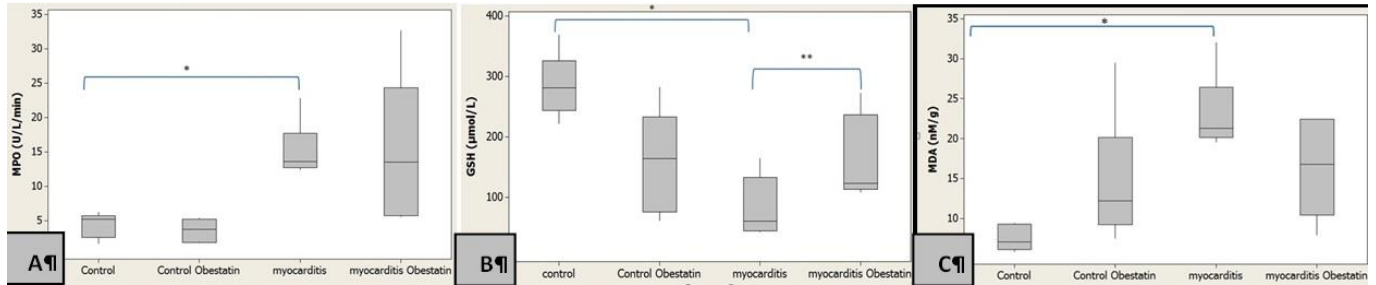
**Resim 4.** Normal ve miyokarditli kalp dokularının makroskopisi A) Miyokarditli genişlemiş, inflame kalp dokusu: Hem epikard hem endokard en büyüğü 0.5 cm çapında sarı beyaz nodüllerle kaplıdır. B) Miyokarditli obestatin tedavisi almamış sıçan kalbin histopatolojisi: LV duvarında belirgin kalınlaşma kavitede dilatasyon dikkat çekmektedir. C) Miyokard hasarına eşlik eden yaygın lenfosit infiltrasyonu(ok) D) Miyokardın geniş mononükleer hücreler tarafından infiltrasyonu (kalın ok). Miyofibril dejenerasyon ve nekrozu (Çerçevele Beyaz oklar) E) Subendokardiyal, interstisyel alana yayılması F) İnterstisyumda çok sayıda mononükleer hücre (ok) ve massif fibrozis(yıldız)

### Serum Miyeloperoksidaz Aktivitesi ve MDA, GSH Düzeyleri

Subkütan domuz kardiyak miyozin uygulanması miyokardit grubunda kontrol grubuna kıyasla belirgin nötrofil artışına neden olarak serum MPO aktivitesinde belirgin artış saptandı ( $p<0.05$ ). Ancak obestatin tedavisinin kardiyak miyozinin neden olduğu bu artışı baskılayamadığı gösterildi ( $p>0.005$ ) (Şekil 1A).

Oksidatif hasarın en önemli belirteci MDA oluşumu olup, bu madde lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Miyokardit grubunda MDA düzeylerinde belirgin artış saptanırken ( $p:0.003$ ), obestatin tedavisi alanlarda azalma saptandı ancak bu anlamlı düzeyde değildi (Şekil 1C).

Glutatyon(GSH) serbest radikallerin yayılmasını sınırlamada kritik öneme sahiptir yokluğu durumunda ciddi lipid peroksidasyonu ile karşılaşılır. Miyokardit grubunda salınan sıçanlarda GSH düzeylerinde belirgin azalma saptandı ( $p<0.001$ ). Obestatin tedavisi alanlarda ise serum GSH düzeylerinde anlamlı artış saptandı ( $p:0.013$ ) (Şekil 1B).

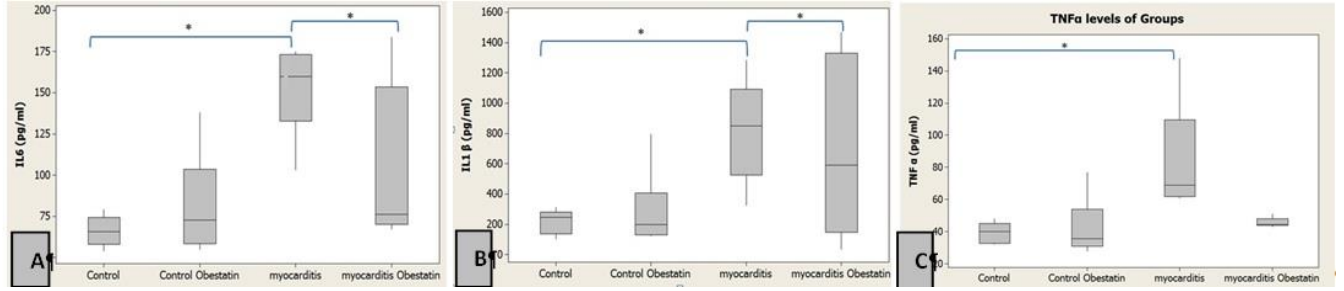


Şekil 1: Süperoksit Dismutaz düzeyleri: MPO, GSH, MDA

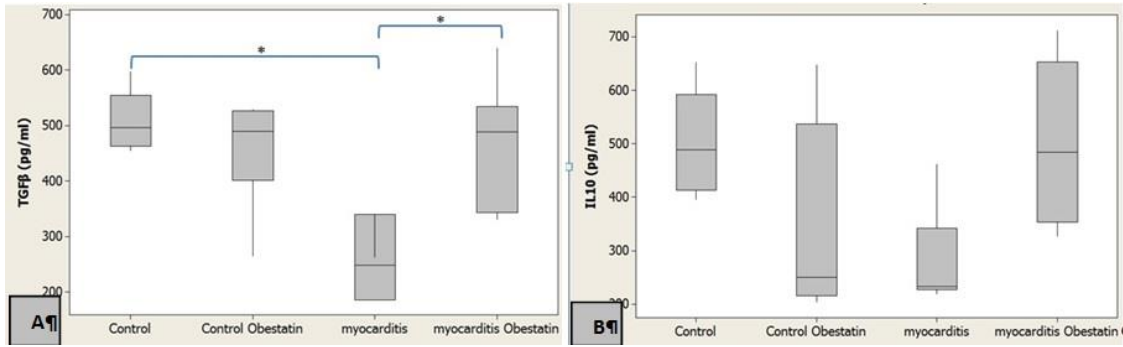
### Sitokin Düzeyleri

Miyokardit grubunda salınan enjeksiyonu yapılan sıçanlarda inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 $\beta$ , IL 6, TNF- $\alpha$ ) serum düzeylerinin belirgin arttığı saptandı ( $p<0.05$ ) (Şekil 2). Obestatin tedavisi IL-1 $\beta$ , IL 6 düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olurken TNF $\alpha$  üzerinde anlamlı etki saptanmadı:

Anti-inflamatuvar sitokinlerden TGF  $\beta$  serum düzeyi miyokardit salın grubunda azalma gösterirken obestatin tedavisi sonrası anlamlı artış saptandı (Şekil 3). Fakat IL 10 düzeylerinde herhangi bir anlamlı değişime rastlanılmadı (Şekil 3).



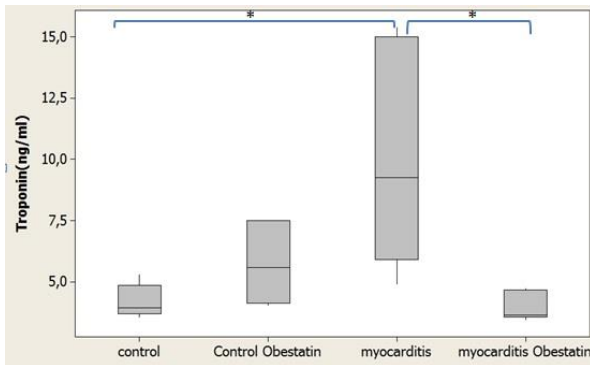
Şekil 2: Proinflamatuvar sitokin düzeyleri: IL6, IL 1β, TNFα



Şekil 3: Anti-inflamatuvar sitokin düzeyleri: TGFβ, IL10

### Troponin Düzeyi

Serum troponin düzeyi miyokardit salin grubunda anlamlı düzeyde artarken obestatin tedavisi sonrası serum düzeyi belirgin azaldı ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4)



Şekil 4: Gruplararası Troponin düzeyi

## Tartışma

Bu çalışma ile obestatin tedavisinin; miyokarditin neden olduğu kilo kaybını önlediği, makroskopik ve mikroskopik hasar derecesini azalttığı gösterildi. Obestatin tedavisinin GSH düzeylerinde anlamlı artışa, IL-1 $\beta$ , IL 6 gibi inflamatuvar sitokin düzeylerinde azalmaya, TGF $\beta$  gibi anti-inflamatuvar sitokin düzeyinde anlamlı artışa neden olduğu gösterildi.

Obestatin ghrelin ile aynı prekürsörden (preproghrelin) elde edilen bir peptid olup enerji metabolizması, gastrointestinal motilitede ghreline zıt etkiler göstermektedir. Ancak kalp üzerinde her ikisinin de farklı mekanizmalarla da olsa benzer kardiyoprotektif etkisi mevcuttur.

Ghrelin reseptörleri kardiyovasküler dokularda yaygın olarak bulunmakta (23), enfarktüs veya septik şok sonrası miyokardiyal kasılma ve vasodilatasyonu artırarak kalp yetmezliğini önlediği yeni çalışmalarda gösterilmiştir (24-26). Ayrıca konjestif kalp yetersizliği olanlarda ghrelin düzeylerinin yüksek olması kardiyoprotektif etkiye sahip olduğunu desteklemektedir (24).

Ghrelinin kardiyoprotektif etkisi daha önce sıçanlarda deneysel iskemi/reperfüzyon hasarı modelinde çalışılmıştır. Ghrelinin koroner akımı arttırdığı, baskılanmış kardiyak fonksiyonları iyileştirdiği ,miyokard oksijen tüketimini azalttığı gösterilmiştir (27). Yazarlar ekzojen ghrelin uygulanmasının iskemik kardiyovasküler hastalarda yeni bir tedavi olabileceğini savunmuşlardır.

Obestatin insanlarda; fizyolojik ve patolojik durumlarda kardiyak işlevlerde önemli rol oynamaktadır. İzole edilen kalp dokusunda iskemik reperfüzyon (IR) hasarı sonrası hücre ölümünü, kardiyomiyositlerin apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (28). Fakat obestatinin kalp dokusu üzerinde anti-inflamatuvar etkisini gösteren bir çalışma mevcut değildir.

Son yıllarda araştırmacılar ghrelin ve obestatinin anti-inflamatuvar etkileri üzerine odaklanmıştır. Ghrelin ve obestatinin anti-inflamatuvar etkileri iskemi reperfüzyon hasarı, endotoksik şok, sepsis (29) ve kolit (10) modellerinde gösterilmiştir.

Ghrelin ve obestatinin anti-inflamatuvar etki mekanizmalarından biri de lipid peroksidasyonunu önlemektir (30,31). Serbest oksijen radikal üretimindeki fazlalık, anti-oksidan miktarındaki yetersizliğin neden olduğu dengesizlik membran lipidlerinin peroksidasyonu, permeabilite artışı, iyon dengesizliği, intrasellüler hasar ile sonuçlanır(32).

Oksidatif hasarın en temel belirteci olan MDA, inflamasyonda artar. Ghrelin tedavisinin doku ghrelin seviyesini azalttığı gösterilmiştir (30,31). Bizim çalışmamızda obestatin tedavisinin serum MDA düzeylerini azalttığını ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterildi. İstatistiksel olarak anlamlı olmamasının nedeni obestatin dozu olabileceği gibi, deney süresinin beklenen etkinin görülmesi için yeterli olmaması da olabilir.

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma miyokarditte obestatinin anti-inflamatuar etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

İnflamasyonun akut fazında, PMNLnin toplanması ardından MPO, elastaz, proteaz ve laktoferrin gibi bazı sitotoksik enzimler salgılanmaktadır. Dolayısıyla MPO seviyesi PMNL sayısı ile doğru orantılıdır (32). Bu çalışmada obestatin, serum MPO düzeylerini azaltmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır buna neden olarak obestatinin dozu düşünülmüştür. Daha yüksek doz obestatin kullanımı halinde MPO seviyelerinin baskılanabileceği öngörüldü.

GSH, yaygın lipid peroksidasyonu ve hücre hasarına yolaçabilen serbest radikallerin yayılımını önlemekte kritik öneme sahiptir. Bizim çalışmamızda miyokardit grubunda serum GSH düzeyleri azalırken, obestatin tedavisi alan grupta istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır.

Otoimmün miyokardit patogenezinde altta yatan immün mekanizma: makrofaj ve T lenfositlerin kardiyak miyozin tarafından otoreaktivasyonudur. Bu makrofaj ve lenfositlerin hedef organa gitmesiyle inflamasyon oluşur (33). Proinflamatuvar ve Th1 sitokinlerin (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$ , ve IL-2) üretimi artarak inflamasyon tetiklenir (34). Literatürde; histolojik miyokardit henüz en ağır fazına geçmeden önce 14. günde IL-1 $\beta$ , IL-6, ve TNF- $\alpha$  nın kalp dokusunda seviyeleri arttığı gösterilmiştir (35). Bizim çalışmamızda deneysel miyokardit modelinde IL-1 $\beta$ , IL 6, TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin arttığı, TGF $\beta$  gibi anti-inflamatuar sitokinlerin istatistiksel olarak azaldığı gösterildi.

Geçmişte obestatinin anti-inflamatuar etkisi sıçan kronik kolit modelinde gösterildi (20). Dolayısıyla biz buradan yola çıkarak obestatinin otoimmün miyokarditte anti-inflamatuar rol oynadığını hipotez ettik. Obestatinin, reaktif oksijen radikal ve proinflamatuvar sitokin üretimini inhibe edip, anti-

inflatuar sitokinlerin üretimini provoke ederek histolojik hasarı tedavi ettiğinin gösterilmesiyle hipotezi doğrulamış olduk. Ayrıca obestatin, ekokardiyografik parametreler ve kalp ağırlığı/ vücut ağırlığı oranında düzelme sağlamıştır.

Miyokardit tedavisi destek tedavisidir. Bazı hastalar sekelsiz olarak iyileşirken bazılarında kardiyak hasar devam etmekte dilate kardiyomiyopati ve ani ölümle sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla tedavi için ipucu olabilecek altta yatan mekanizmalara ilişkin çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamız obestatinin anti-inflatuar etkilerine ışık tutuyor olması, gelecekteki miyokardit tedavi modelleri için umut vaat etmesi bakımından önem taşımaktadır.

**Kaynaklar:**

1. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 2006;113:876-90.
2. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart* 2006;92:316-20.
3. Doolan A, Langlois N, Semsarian C. Causes of sudden cardiac death in young Australians. *Med J Aust* 2004;180:110-2.
4. Felker GM, Hu W, Hare JM, Hruban RH, Baughman KL, Kasper EK. The spectrum of dilated cardiomyopathy. *The Johns Hopkins experience with 1,278 patients. Medicine (Baltimore)* 1999;78:270-83.
5. McCarthy RE 3rd, Boehmer JP, Hruban RH *et al.* Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med* 2000;342:690-5.
6. Myocarditis: Infection Versus Autoimmunity. Noel R. Rose *J Clin Immunol* (2009) 29:730–737
7. Burian J, Buser P, Eriksson U. Myocarditis: the immunologist's view on pathogenesis and treatment. *Swiss Med Wkly.* 2005;135:359-64.
8. Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, *et al.* Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology.* 2004 Sep;145(9):4144-53.
9. Zhang JV, Ren PG, Vspan-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005;310: 996-999
10. Pamukcu O, Kumral ZN, Ercan F, Yegen BC, Ertem D. Anti-inflammatory effect of obestatin in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013 Aug;57(2):211-8
11. Matsui Y, Okamoto H, Jia N, Akino M, Uede T, Kitabatake A, Nishihira J. Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:557–566.
12. Otsuka K, Terasaki F, Ikemoto M, Fujita S, Tsukada B, Katashima T, Kanzaki Y, Sohmiya K, Kono T, Toko H, Fujita M, and Kitaura Y. Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8 A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network. *Eur J Heart Fail.* 2009;11:229 –237.
13. Sato M, Toyozaki T, Odaka K, Uehara T, Arano Y, Hasegawa H, Yoshida K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, Tadokoro H, Irie T, Tanada S, and Komuro I. Detection of experimental autoimmune myocarditis in rats by 111In monoclonal antibody specific for tenascin-C. *Circulation.* 2002;106:1397–1402.
14. Yuan Z, Kishimoto C, Shioji K, Nakamura H, Yodoi J, Sasayama S. Temocapril treatment ameliorates autoimmune myocarditis associated with enhanced cardiomyocyte thioredoxin expression. *Cardiovasc Res.* 2002, 1;55(2):320-8.
15. Yuan Z, Nimata M, Okabe TA, Shioji K, Hasegawa K, Kita T, Kishimoto C. Olmesartan, a novel AT1 antagonist, suppresses cytotoxic myocardial injury in autoimmune heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(3):H1147-52. 2005.
16. Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T, Shibata A. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 57:250-262.

17. Yuan Z, Shioji K, Kihara Y, Takenaka H, Onozawa Y, Kishimoto C. Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis. Anti-inflammatory effects associated with antioxidant property. *Am J Physiol* 2004;286: H83-90
18. Felker GM, Hu W, Hare JM, Hruban RH, Baughman KL, Kasper EK. The spectrum of dilated cardiomyopathy. *The Johns Hopkins experience with 1,278 patients. Medicine (Baltimore)* 1999;78:270-83.
19. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1999; 111:383–9.
20. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1978; 95: 351–8.
21. . Si F, Ross G.M, Shin S.H. Glutathione protects PC12 cells from ascorbate- and dopamine-induced apoptosis. *Exp.Brain Res.* 1998, 123, 263-268.
22. Momen-Beitollahi, A. Mansourian, F. Momen-Heravi, M. Amanlou, S. Obradov, and M. Sahebamee, “Assessment of salivary and serum antioxidant status in patients with recurrent aphthous stomatitis,” *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, vol. 15, no. 4, pp. e557–e561, 2010.
23. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, *et al.* The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2988.
24. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shmizu W, *et al.* Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001;104: 1430-5.
25. Chang L, Du JB, Gao LR, Pang YZ, Tang CS. Effect of ghrelin on septic shock in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24:45-9.
26. Chang L, Zhao J, Yang J, Zhang ZK, Du JB, Tang CS. Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 473: 171-6.
27. Chang L *et al* / Ghrelin protects myocardium from isoproterenol-induced injury in rats *Acta Pharmacol Sin* 2004 Sep; 25 (9): 1131-1137
28. Alloatti G, Arnoletti E, Bassino E, Penna C, Perrelli MG, Ghe C, Muccioli G: Obestatin affords cardioprotection to the ischemic-reperfused isolated rat heart and inhibits apoptosis in cultures of similarly stressed cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, 299:H470–481
29. De Smet T, Thus D, Moechars B, *et al.* Endogenous and exogenous ghrelin enhance the colonic and gastric manifestations of dextran sodium sulphate-induced colitis in mice *Neurogastroenterol Motil.* 2009, 21,59–70.
30. Sehirli O, Sener E, Sener G, *et al.* Ghrelin improves burn-induced multiple organ injury by depressing neutrophil infiltration and the release of pro-inflammatory cytokines. *Peptides.* 2008, 29:1231-1240.
31. İşeri SO, Sener G, Yuksel M, *et al.* Ghrelin against alendronate-induced gastric damage in rats. *J Endocrinol.* 2005, 187:399-406.

32. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2000, 67:591-602.
33. Kodama M, Hanawa H, Zhang S, Saeki M, Koyama S, Hosono H, Miyakita Y, Katoh K, Inomata T, Izumi T, Shibata A. FK506 therapy of experimental autoimmune myocarditis after onset of the disease. *Am Heart J* 1993;126:1385–1392.
34. Okura Y, Yamamoto T, Goto S, Inomata T, Hirono S, Hanawa H, Feng L, Wilson CB, Kihara I, Izumi T, Shibata A, Aizawa Y, Seki S, Abo T. Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:491–502.
35. Eriksson U, Kurrer MO, Schmitz N, Marsch SC, Fontana A, Eugster HP, Kopf M. Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement C3. *Circulation* 2003 Jan 21;107(2):320-5