

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA ERİTROPOİETİNİN
KORUYUCU ETKİSİNE
K-ATP KANALLARININ KATILIMI**

Nuray YAZIHAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
FİZYOLOGİ DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Güzin ÖZELÇİ KAVAS

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Haluk ATAÖĞLU

2007-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA ERİTROPOİETİNİN
KORUYUCU ETKİSİNE
K-ATP KANALLARININ KATILIMI**

Nuray YAZIHAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
FİZYOPATOLOJİ DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Güzin ÖZELÇİ KAVAS

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Haluk ATAÖĞLU

**Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
20070809250 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.**

2007-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyopatoloji Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan “Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Eritropoietinin Koruyucu Etkisine K-ATP kanallarının Katılımı” başlıklı,
Dr. Nuray Yazihan’a ait çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi: 28/06/2007

Ankara Üniversitesi
Prof. Dr. Bülent Erbay
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Gzin Özelçi Kavas
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyopatoloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ethem Akçıl
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyopatoloji Bilim Dalı
Üye

Prof. Dr. Murat Aksoy
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye

Prof. Dr. Kubilay Uzun
Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Üye

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Genel Bilgiler.....	1
1.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı Nedir? Renal İskemi ve Reperfüzyon Gelişim Mekanizmaları.....	3
1.1.2. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı Oluşum Mekanizmaları.....	4
1.1.2.1.İskemik Faz.....	6
1.1.2.2. Reperfüzyon Fazı.....	10
1.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında K-ATP Kanallarının Rolü	14
1.1.3.1. K Kanalları.....	14
1.1.3.2. K ⁺ Kanallarının Böbrekteki Fizyolojik Rollerini: K ⁺ Homeostazisinde Renal K ⁺ Transportunun Katılımı.....	14
1.1.3.4. Mitokondriyal K-ATP Kanalları	16
1.1.4. İskemi Reperfüzyon Hasarına Proinflamatuvar Sitokinlerin Katılımı.....	20
1.1.5. Önşartlanma Mekanizmaları.....	23
1.1.5.1. Hipoksi ile Uyarılabilen Faktör (HIF).....	25
1.1.6. İskemi ve Reperfüzyon Hasarında Oksidatif ve Nitrosatif Stres.....	29
1.1.7. Eritropoietin.....	31
1.1.7.1.Eritropoietinin Hematopoezde Rolü.....	32
1.1.7.2.Eritropoietin Yapımı.....	32

1.1.7.3. Eritropoietin ve Böbreklerde Oksijen Algılayıcı Mekanizma.....	33
1.1.7.4. Eritropoietin Reseptörleri.....	34
1.1.7.5. Eritropoietinin İskemi Reperfüzyon Hasarında Koruyucu Etkisi.....	35
1.1.7.6.Eritropoietin ve K-ATP Kanalları.....	38
1.1.8. Midkin ve Iskemi Reperfüzyon Hasarı.....	40
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	43
2.1. Gereçler.....	43
2.1.1. Deney Hayvanları.....	43
2.1.2. Kullanılan Madde ve Aletler.....	43
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	43
2.1.4. Kullanılan Gereçler.....	45
2.1.4.1. Cerrahi Malzemeler.....	45
2.1.4.2. Diğer Gereçler.....	45
2.2. Cerrahi İşlem ve Deney Protokolü.....	46
2.2.1. Anestezi ve Operasyona Hazırlık.....	46
2.2.2. Femoral Ven Kateterizasyonu.....	47
2.2.3. İdrar Kesesi Kateterizasyonu.....	47
2.2.4. Renal Arter ve Ven İskemisi.....	48
2.3.5. Deney Protokolü.....	48
2.3.6.Tez Kapsamında Değerlendirilen Parametreler.....	50
2.4. Analiz Yöntemleri	51
2.4.1. Histopatolojik İnceleme.....	51
2.4.2. Apoptosis Değerlendirilmesi	51
2.4.3. Doku Sitokin ve Midkin Düzeylerinin Ölçümü.....	52
2.4.4. BCA (bicinchoninic acid) Protein Ölçüm Kiti ile Protein Miktar Tayini....	53
2.4.5. Nitrit Ölçümü.....	54
2.4.6. Doku mRNA Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	54
2.4.7. Üre, Kreatinin, Glukoz, Na, K Düzeylerinin Ölçümü.....	54
2.4.7.1. Glomeruler Filtrasyon Hızı, Fraksiyone Na ve K Atılımlarının Hesaplanması.....	54
2.5. İstatistiksel Analiz.....	54

3. BULGULAR.....	57
3.1. Histopatolojik Değerlendirme.....	57
3.2. Apoptosis Sonuçları	60
3.3. Doku Sitokin Düzeyleri	61
3.3.1. Doku TNF- α Düzeyleri.....	61
3.3.2. Doku IL-6 Düzeyleri.....	62
3.4. Doku Midkin Düzeyleri.....	63
3.5. Doku Nitrit Düzeyleri.....	64
3.6. Doku mRNA Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	65
3.7. Kardiyo- Renal Fonksiyonların Değerlendirilmesi.....	66
3.7.1. Gruplara Göre Sistolik Basınç, Kalp Hızı, Kan Glukoz Düzeyleri.....	66
3.7.2. Glomerüler ve Tübüler Fonksiyonların Değişimleri.....	67
4. TARTIŞMA.....	70
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
ÖZET.....	83
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	102
Ek. ETİK KURUL KARARI.....	110

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım da yardımcı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Güzin Özelçi Kavas'a; tez çalışmalarım sırasında bilgi ve yöntemlerde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve kendimi geliştirmemde büyük emeği bulunan Sayın Prof. Dr. Haluk Ataoğlu'na, tezimin yönlendirilmesindeki destekleri için Sayın Prof. Dr. Bülent Erbay ve Prof. Dr. Ethem Akçıl'a; Fiziopatoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Pelin Arıbal Kocatürk'e, tez çalışmalarım sırasındaki destek ve yardımları için Bio.Burcu Yener ve Tek. Hüseyin Keskinbaş'a, çalışmam kapsamındaki histopatolojik değerlendirmeleri çok kısa sürede gerçekleştiren ve bu konuda her türlü desteği veren Sayın Doç. Dr. Nalan Akyürek'e;

Hayatım boyunca her zaman yanımda olmuş, başarılarımın esas kaynağını oluşturan ve bugünlere gelmem için maddi manevi desteğini hiç esirgemeyen sevgili aileme;

Hayatımı anlamlı hale getiren, yoğun çalışmalarım sırasında beni hep anlayışla karşılayarak destek olmuş sevgili oğlum Mehmet'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Dr. Nuray YAZIHAN

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	Mikrolitre
20-HETE	20-hidroksi eikozatetranoik asit
5-HD	5-hydroxydecanoate
AA	Arakidonik asit
ABY	Akut böbrek yetmezliği
ALK	Anaplastik lösemi kinaz
ANG II	Anjiotensinojen II
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
ARNT	Aril hidrokarbon reseptör nükleer transloke edici protein-
BCA	Bicinchoninic acid
bFGF	Fibroblast büyüme faktörü
CFU-E	Koloni oluşturan birim eritrosit
cNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz
CO	Karbon monoksit
CTGF	Konnektif doku büyüme faktörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELİSA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
EPO	Eritropoietin
FeK	Fraksiyone potasyum atılımı
FeNa	Fraksiyone sodyum atılımı
GFR	Glomeruler filtrasyon hızı
GLUT 1	Glukoz taşıyıcı 1
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
H₂O₂	Hidrojen Peroksit

HB-GAM	Heparin bağlayan büyüme ilişkili molekül
HBNF	Heparin bağlayıcı nöronal faktör
HIF-1α	Hypoxia inducible factor-1 α
HO-1	Heme Oksijenaz-1
HR	Kalp hızı
HSP	Isı şok proteini
I/R	İskemi reperfüzyon
ICAM-1	İntrasellüler adhezyon molekülü-1
IFN	İnterferon
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
K-ATP kanallar	ATP bağımlı K kanalları
kDa	Kilodalton
Kir	İçeri (inward) rektifiye K kanalları
KOH	Potasyum hidroksit
Kv	Voltage kapılı K ⁺ kanalları
LPS	Lipopolisakkarid
LRP	Düşük moleküler ağırlıklı lipoprotein reseptör ilişkili protein
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
MIP-2	Makrofaj inflamatuvar protein-2
mitoK_{ATP}	Mitokondriyal ATP bağımlı K kanalları
ml	Mililitre
MLA	Monophosphoryl lipid A
μM	Mikromolar
MPO	Myeloperoksidaz
NEDD	N-(1-naftil) etidiamin
NGF	Nöron büyüme faktörü
NO	Nitrik oksit
OSF-1	Osteoblast stimüle edici faktör
PAF	Trombosit aktive edici faktor
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

PDGF	Trombositten köken alan büyüme faktörü
PIP2	Fosfotidilinositol 4,5-bifosfat
PK A	Protein kinaz A
PK C	Protein kinaz C
PK G	cGMP bağımlı protein kinaz
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PMN	Polimorfonükleer
pmol	Pikomol
PTK	Protein tirozin kinaz
PTP z	Protein tirozin fosfataz z
rHuEPO	Rekombinant eritropoietin
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
SCF	Stem hücre faktör
SNAP	S-nitrso-N-acetyl-DL-penicillamine
SOCS-box	Suppressor of cytokine signaling proteins
SP	Sistolik basınç
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TIMP-1	Doku metalloproteinaz-1 inhibitörü
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VHL	Von Hippel Lindau

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1: I/R hasarına cevap olarak aktive olan apoptotik süreçler.....	5
Şekil 1.2: Renal iskemi sonrası hücreyel değişimler.....	7
Şekil 1.3: Renal epitel hücrelerinde zamana bağlı hasarlanma.....	8
Şekil 1.4: Renal I/R hasarına sitokinlerin ve inflamatuvar sürecin katılımı.....	12
Şekil 1.5: Renal iskemi sonrası renal hemodinamideki değişimler.....	13
Şekil 1.6: ATP bağımlı K kanallarının hücrede metabolik dengeye katılımı.....	17
Şekil 1.7: ATP bağımlı K kanallarının regülasyonu.....	19
Şekil 1.8: Hücre içinde K kanallarının katıldığı fizyopatolojik süreçler.....	20
Şekil 1.9: TNF ve diğer proinflamatuvar sitokinlerle apoptosis aktivasyonu.....	22
Şekil 1.10: Hipoksik uyarıya bağlı HIF aktivasyonu.....	26
Şekil 1.11: Böbrekte HIF bağımlı aktive olan genler.....	28
Şekil 1.12: Oksidatif stres.....	31
Şekil 1.13: EPO reseptörü, aktivasyonu ile başlayan sinyal iletim yolları.....	35
Şekil 1.14: EPO nun antiapoptotik ve sitoprotektif etkisine katılan moleküller ve sinyal iletim yolları.....	38
Şekil 1.15: EPO ve ATP bağımlı K kanalları.....	39
Şekil 1.16: Midkinin yapısı.....	40
Şekil 1.17: Midkinin reseptör tipi.....	41
Şekil 3.1: Grupların değerlendirilmesinde kullanılan skorlamaya örnek böbrek dokuları.....	58
Şekil 3.2: Histopatolojik inceleme sonucunda her bir gruptan elde edilen skorlar..	59
Şekil 3.3: IR hasarı sonucu apoptosis değerlendirilmesi, grupların doku kaspaz-3 düzeyleri.....	60
Şekil 3.4: Doku TNF- α düzeyleri.....	61
Şekil 3.5: Doku IL-6 düzeyleri.....	62
Şekil 3.6: Doku midkin düzeyleri.....	63
Şekil 3.7: Doku nitrit düzeyleri.....	64

Sayfa

Şekil 3.8: Sham grubu böbrek dokusunda HIF-1 α ve β -aktin mRNA ekspresyonları ve moleküler ağırlık standartı.....	65
Şekil 3.9: Doku HIF mRNA ekspresyonları.....	65

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1: Renal iskemik hasar.....	7
Tablo 1.2: Akut renal yetmezliğin fizyopatolojisi.....	9
Tablo 1.3: İskemik önşartlanmada rol alan mediatörler ve etki mekanizmaları	23
Tablo 3.1: Gruplara göre sistolik basınç, kalp hızı, kan glukoz düzeyleri.....	67
Tablo 3.2: Gruplara göre renal parametre değişimleri.....	69

1. GİRİŞ

1.1.Genel Bilgiler

İskemik böbrek yetmezliği oldukça sık karşılaşılan ve genellikle %50 ölümlerle sonuçlanan ciddi bir sorundur. Gerek iskemik hasarın gerekse reperfüzyon hasarının fizyopatolojisiyle ilgili pek çok teori ve buna yönelik tedaviler ortaya konmuş olsa da henüz yeterli değildir (Textor, 2004).

Eritropoietin (EPO); 165 aminoasitten oluşan 30 kDa ağırlığında glikoprotein yapısında eritropoezden sorumlu hormondur. EPO yapımı; plazma düzeyinden bağımsız olarak hipoksiyle uyarılır ve yine hipoksi olduğunda kan eritrosit sayısının yüksek olması kan EPO düzeyini tamamen baskılayamaz ve hematopoez devam eder. EPO; vücutta doku oksijenlenmesini kontrol eden ana hormondur. Rekombinant formu (rHuEPO) biyolojik olarak doğal hormonla aynı özelliklere sahiptir ve günümüzde kronik böbrek yetmezliği sürecindeki hastaların anemi tedavisinde kullanılmaktadır. EPO'nun primer salgın ve yapım yeri böbreklerdir (Winearls, 1998; Fisher ve Nakashima, 1992). Fakat böbrek dışında; gastrointestinal sistem, akciğer, genitoüriner sistem, santral sinir sistemi gibi pek çok dokuda da EPO yapımı ve reseptörleri gösterilmiştir (Juul, 2000).

Son dönemde EPO'in iskemik hasardan koruyucu etkisi bulunduğunu gösteren çalışmalar artmaktadır. EPO'nun; farklı doku ve hücrelerde iskemi-reperfüzyon (I/R) modellerinde uygulandığında önşartlanma benzeri etki yaratarak I/R hasarından koruyucu olduğu görülmüştür (Yang ve ark. 2003). EPO'nun akut böbrek yetmezliğinde (ABY), sisplatin ile oluşturulan akut tübüler toksisite modelinde (Bagnis ve ark., 2001) ve renal I/R hasarında anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, anti-oksidan etki göstererek koruyucu olduğu görülmüştür (Sharples, 2004). Jak2-STAT-Bcl-2 yolları EPO'nun koruyucu etkisinde rol alan temel sinyal iletim yollarıdır (Sturiale, 2007).

İskemik hasarı takiben ilk cevap HIF-1 α (hypoxia inducible factor) yapımıdır. HIF-1 α ; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), glikolitik yol enzimleri gibi molekül ve enzimlerin ekspresyonunda artışa neden olur (Semenza 2002, Wenger 2002). İskemiye cevap olarak nötrofiller, monositler iskemik alana hücum ederek TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 gibi inflamatuvar sitokinler salınmaya başlar. HIF-1 α 'nın doğrudan TNF- α salınımını arttırdığına dair yayınlar da mevcuttur. TNF- α 'nın inflamatuvar olayları başlatıcı etkisini takiben salınan endotelin-1, prostaglandinler, trombosit aktive edici faktör (PAF) ile vasküler vazokonstriksiyona neden olarak glomerüler filtrasyon hızını (GFR) azaltmaktadır. Renal mezenkim hücrelerinden de TNF- α salınımı olduğu gösterilmiştir (Donnahoo ve ark. 1999, Brines ve Cerami 2006). EPO'nun böbreği koruyucu etkisine TNF- α ve IL-6 gibi sitokin yapımının katılımının olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Midkin, retinoik asitle salınımı artan, heparine bağlanan büyüme faktörüdür. Böbrek ve beyin gelişiminde önem taşımaktadır. İskemik hasarda midkin yapımının arttığı ve koruyucu olduğu gösterilmiştir (Muramatsu, 2002). Midkinin renal I/R hasarında nötrofillerin infiltrasyonunda ve migrasyonunda önemli rolü olduğu bulunmuştur (Sato ve ark., 2001).

İskemi ve I/R hasarı böbrekte oldukça sık karşılaşılan ve ciddi sonuçlara neden olabilen patolojik süreçlerdendir. Bu süreçlerde EPO ve ATP bağımlı K (K-ATP) kanallarının etkileşimine ilişkin az sayıda çalışma vardır; sadece in vitro myokard iskemisi modeliyle yapılan bir çalışma mevcuttur. İn vitro myokardiyal iskemi modelinde EPO'nun koruyucu olduğu ve bu koruyucu etkide K-ATP kanallarını aktive olmasının önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Joyeux-Faure, 2006). Böbrek I/R modellerinde K kanal blokajının etkisi ile ilgili de yayınlar vardır ama çelişkilidir. K-ATP kanalları; mitokondriyal fonksiyonları düzenleyerek özellikle önşartlanmada önem taşırlar (Hai ve ark. 2005). İskemik önşartlanmada K-ATP kanallarının aktivasyonunun çok önemli olduğunu gösteren pek çok yayın bulunmakla beraber; ATP bağımlı K kanal blokörü olan ve antidiabetik etkisi bulunan glibenklamidin renal I/R hasarından koruyucu etkisi olduğuna dair çalışmalar da dikkat çekmektedir

(Han, 2002; Pompermayer, 2005). EPO'in renal I/R hasarından koruyucu etkisinde bu mekanizmanın da etkin olup olmadığı, son dönemlerde özellikle kanser çalışmalarında yer almaya başlayan midkinin I/R hasarındaki rolü çelişkilidir ve EPO'nin midkin düzeyine olan etkisiyle ilgili henüz çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada EPO, K-ATP kanallarının ve midkinin iskemi reperfüzyon hasarı üzerine olan etkileriyle ilgili moleküler, inflamatuvar, anti-apoptotik mekanizmaların araştırılması amaçlanmaktadır.

1. 1. 1. İskemi Reperfüzyon Hasarı Nedir? Renal İskemi ve Reperfüzyon Hasar Gelişim Mekanizmaları :

Dokuda; sıcak veya soğuk iskemiyi takiben yeniden kanlanmanın sağlanması yani reperfüzyon ile beraber dokuya hızla oksijen ulaşır. I/R hasarı; cerrahide, kardiyovasküler sistemde, transplantasyon sırasında ve benzer alanlarda sıklıkla karşılaşılan morbiditenin hatta bazen mortalitenin sebebidir. I/R hasarı sonrası gelişen mekanizmalar oldukça komplekstir ve birbirlerini aktive ederler, bu nedenle aslında her bir mekanizmayı tek tek inceleyerek ve tek bir mekanizmaya bağlı genel yorum yapmak bazen yanlış yorumlamalara neden olabilmektedir. Gelişen mekanizma ne olursa olsun I/R hasarının sonucu reversible veya irreversible hücre polarizasyonunda bozulma, apoptosis ve/veya hücre ölümü ile sonuçlanır. I/R hasarının erken dönemlerinde mitokondriyal fonksiyonlar önemli rol oynarken ileri dönemlerde inflamasyon, reaktif oksijen ürünleri, kemokinlerin aktivasyonu, membran lipidlerinin bozulması, apoptosis ilişkili moleküllerin açığa çıkması daha belirgin hale gelir.

Apoptosis göstergesi olan kaspaz-3 düzeyi de organda oluşan I/R hasar düzeyine bağlı olarak artar, bu durum I/R sonrası apoptosis ve hasarın fas veya mitokondri aracılı bir yolla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bununla beraber organa spesifik cevaplar da oluşmaktadır; karaciğerde Fas ligand aktivasyonu daha belirginken kalpteki hasarda PK C /akt yolu aktivasyonu önem taşır (Cursia ve ark. 2005, Downey ve ark.2007).

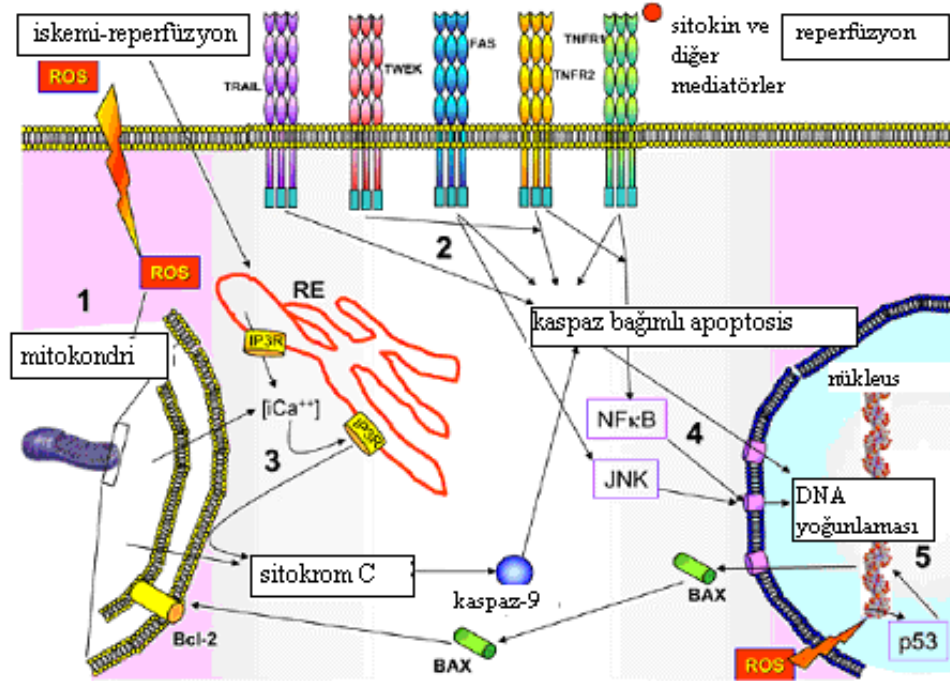
1.1.2. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı Oluşum Mekanizmaları:

Akut böbrek yetmezliği; yüksek morbitite ve mortalite ile giden ve klinikte sık karşılaşılan bir sorundur. ABY sürecinde; glomerüler filtrasyon hızı saatler-haftalar içerisinde azalması sonucunda kanda nitrojen yıkım ürünleri birikir. Prerenal (% 55-60), renal (%35-40) ve postrenal (<%5) olmak üzere 3 grupta incelenir. Prerenal nedenler; böbreğe gelen kan miktarının azalmasıyla ilgili nedenlerdir. Bunlara yetersiz dolaşım, kardiyak yetmezlikler, vasküler disfonksiyonlar, azalmış intravasküler volüm sayılabilir. Renal nedenlerin ise en sık sebebi iskemik veya toksik renal yetmezliktir. Genel olarak bakıldığında ABY patogeneğinde böbreğe gelen kan akımının yeterli olmamasının önemli yer tuttuğunu görülür. İskemik böbrek yetmezliğiyle ilgili pek çok çalışma yapılmış ve hala yapılıyor olmasına rağmen tüm mekanizmalar henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir.

Böbrekte I/R hasarı; kardiyak yetmezlikler, cerrahi müdahaleler sırasında, embolilerde, trombozların sonucu olarak , hipovolemi durumlarında, şokta, ve organ transplantasyonları gibi pek çok patolojik durumlarda gelişir. Böbrek vücutta en iyi perfüze olan organ olması nedeniyle hipoperfüzyona da en çok duyarlı organlardan biridir. Böbreğe gelen kanın büyük çoğunluğu kortekse yönelerek glomerüler filtrasyon ve solütlerin absorpsiyonunu optimize eder. Bunun aksine medullar bölgede, kortekse göre daha çok oksijen kullanımıyla devam eden osmotik dengenin korunumu ve üriner konsantrasyonun devamı gibi olaylar daha az kan akımıyla sağlanır.

Genel olarak I/R hasarı sonrası kompleman sistemi aktive olur, sitokin ve kemokin salınımı gerçekleşir, nötrofiller olay yerinde birikerek inflamasyon sürecini artırır. Vasküler endotel hasarının da olaya eklenmesiyle de vasküler permeabilite artar, kongesyon başlar, ödem gelişir ve daha fazla inflamatuvar hücre dokuda birikmeye başlar (Donnahoo ve ark. 1999). Hücre içi ve dışı apoptotik yollar; inflamatuvar sitokinler, artmış reaktif oksijen ürünleri, mitokondriyal ATP' deki

azalma ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu takiben H^+ gradientinin bozulmasına bağlı olarak aktive olurlar (Şekil 1.1). Hipoksik hasarı takiben; ATP'deki azalma mitokondriyal disfonksiyona neden olur ve hücre içinde kalsiyum, sodyum ve reaktif oksijen ürünleri birikmeye başlar. Bunu proteazlar, nitrik oksit sentazlar, fosfolipazlar, ve endonükleazlar gibi pek çok enzim sisteminin aktivasyonu izler ve hücre iskelet yapısında bozukluğa, membran hasarına, DNA degradasyonuna ve sonuç olarak da hücre ölümüne neden olur (Lopez-Neblina ve ark., 2005)



Şekil 1.1: I/R hasarına cevap olarak aktive olan apoptotik süreçler: 1. Hücre içinde yapımı artmış olan ROS' a karşı uyarılmış internal yol, 2. Hücre membranında bulunan reseptörlerin ortamdaki sitokin ve diğer mediatörlere cevap olarak aktive olan yollar, 3. Hücre içi kalsiyum salınımının artmasına bağlı pro-apoptotik aktivitenin artması, 4. NFκB ve JNK gibi hücre içi apoptotik yolların olaya doğrudan veya dolaylı katılımı, 5. p53' ün pro-apoptotik protein BAX' ı aktive etmesi (Lopez-Neblina ve ark., 2005)

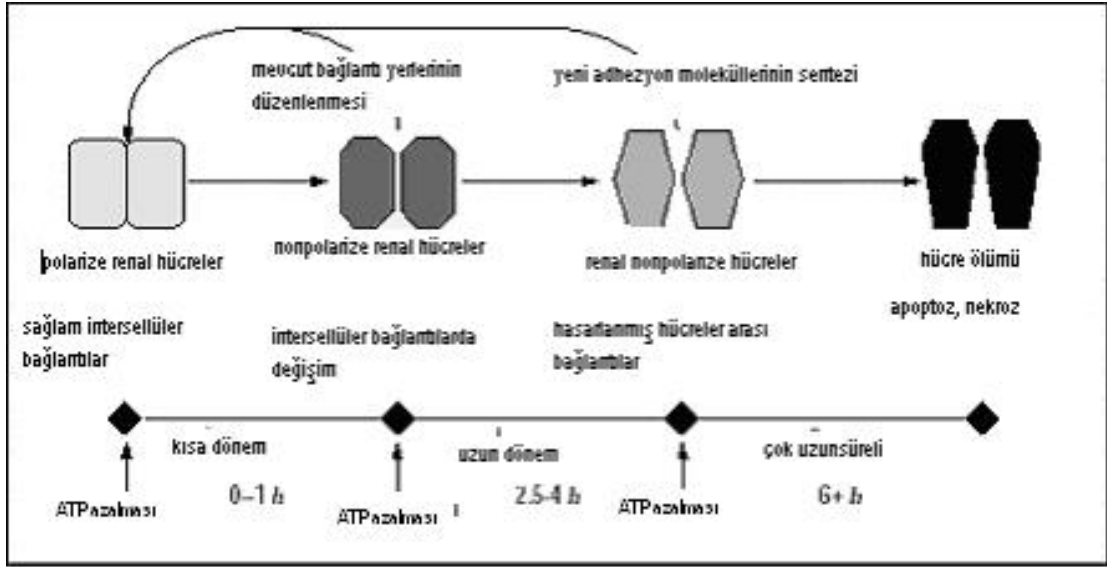
1.1.2.1.İskemik Faz:

Renal I/R bir dizi olayın sonucudur. Böbreğe olan kan akımı dokunun metabolik ihtiyaçlarını karşılayamayacak düzeyde olduğunda renal tübüler hücrelerde bazı patolojik olaylar başlar (Şekil 1.2, 1.3). Eğer iskemik süreç uzarsa dokuda ciddi hasarla sonuçlanır.

Hücresele düzeyde bakıldığında; iskemi intrasellüler ATP miktarının düşmesiyle beraber aerobik metabolizmadan anerobik metabolizmaya geçişine neden olur. ATP bağımlı enzimlerin fonksiyon bozukluğu ile beraber Na-K ATP az gibi önemli iyon transport sistemleri de etkilenir, hücre içi kalsiyum birikimi başlar.

Hücre içi kalsiyum artışı; hücre içi yolakların aktivasyonu için önemli bir uyarandır, fosfolipazlar gibi kalsiyuma hassas enzimleri de aktive eder. Fosfolipaz A2 aktivasyonu ile membran fosfolipidleri bozulmaya başlar; plazma ve mitokondriyal membran bioenerjetikleri ve geçirgenlikleri de değişir. Bununla beraber fosfolipaz A2 aktivasyonu prostasiklin ve PG I2 gibi metabolitlerin yapımını arttırarak lökosit adhezyonunu inhibe ederek renal I/R hasarından koruyucu rol oynayabilir. ATP önce ADP ve AMP' ye defosforile olur. Sonra adenosine, takiben ksantin ve inosin ve hipoksantine dönüşür. İnosinden sonraki basamaklar ise irreversibledir (McMichael ve Moore, 2004).

Şekil 1.2' de uygulanan iskeminin süresine bağlı olarak böbrek tübül hücrelerindeki değişimler ve hasarlanma dereceleri görülmektedir.



Şekil 1.2: Renal epitel hücrelerinde zamana bağlı hasarlanma: Renal epitel hücrelerindeki hasarlanma iskemi süresinin uzunluğuna göre değişir. 0 saatlik kısa süreli hasarlar hücrede apoptozis, polarizasyon kaybıyla giderken süre uzadıkça 4-6 saatten daha fazla iskemiye maruz kalmasıyla kalıcı hasar ve dokuda nekroz oluşur (Atlas of Kidney Diseases).

Şekil 1.3 de ve Tablo 1.1' de renal iskemik hasarlanmanın hüresel düzeyde yol açtığı değişiklikler ve bunların fonksiyonel sonuçları verilmektedir.

Tablo 1.1: Renal iskemik hasar: Renal iskemide en çok etkilenen bölge tübüllerdir.

Klinik faz

- Prerenal azotemi,
azalmış kan akımı,
azalmış GFR
- Başlangıç
- Adaptasyon
- İyileşme

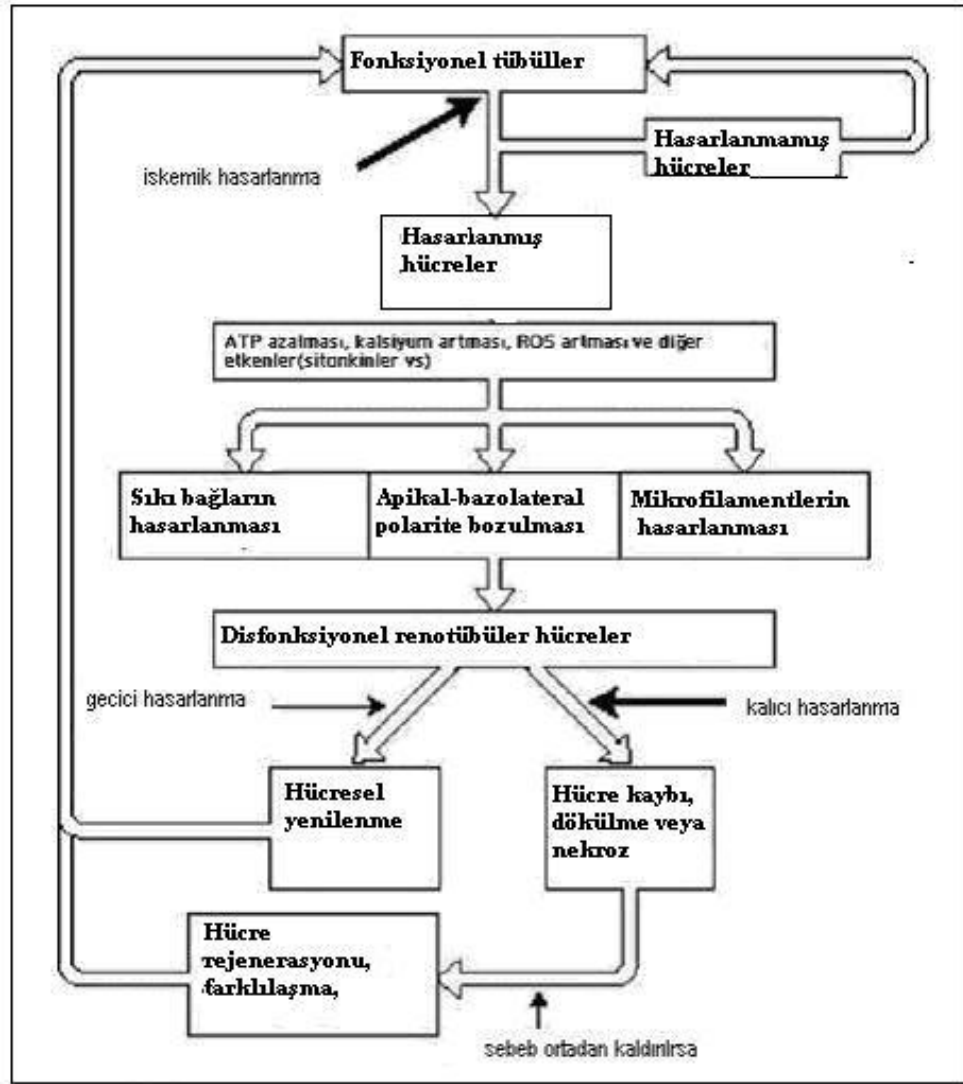
Hüresel faz

Hüresel bütünlük korunur
adaptasyon

ATP azalması, hüresel hasar
inflamasyon

Apoptosis, tübüler yapıların
yenilenmesi, proliferasyon,

Çoğalan hücrelerin
farklılaşması zaman içinde
gerçekleşir.



Şekil 1.3: Renal iskemi sonrası hüresel değişimler: İskemik hasar sonrasında tübül hücrelerinde ATP azalması, ROS artmasına bağlı olarak apikallerden başlamak üzere polarite bozulması, hücre iskeletinin bozulması ve hücre dökülmesine kadar giden hücre hasar aşamaları oluşur. Bu durum iskemiyin süresine ve şiddetine göre geçici veya kalıcı olabilir (Atlas of Kidney Diseases)

İskemik hasarlanma sonrası tübüler hasarlanma doğrudan da olabilir, vasküler yapıdaki değişime bağlı olarak da ortaya çıkabilir. Tablo 1.2’de her iki mekanizmada yer alan molekül ve mekanizmalar sıralanmıştır.

Tablo 1.2: Akut renal yetmezliğin fizyopatolojisi: 2 kısımdan oluşur:

Mikrovasküler ve tübüler hasarlanma:

1. Mikrovasküler Evre:

•Vazokonstriksiyonda artış:

–Renal sinirler

–Anjiotensin II

–Endotelin

•Vasodilatasyonun azalması:

–Asetik kolin

–Bradikinin

–Nitrik oksit

•İnflamasyon varlığı:

–Lökosit-endotelial adhezyon

–Lökosit aktivasyonu ve inflamasyon-vasküler obstrüksiyon

•Prokoagulasyon artması:

–Thrombomodulin

–Doku plazminojen aktivatör ve inhibitör–Aktif protein C, NO

•Komplement aktivasyonu

2. Tübüler Hasarlanma Evresi:

•Hücre iskeleti yıkımı

•Polaritenin bozulması

•Apopitoz ve nekroz

•Yaşayan ve nekrotik hücrelerde dökülme

•Tübüler obstrüksiyon

•Geri kaçma

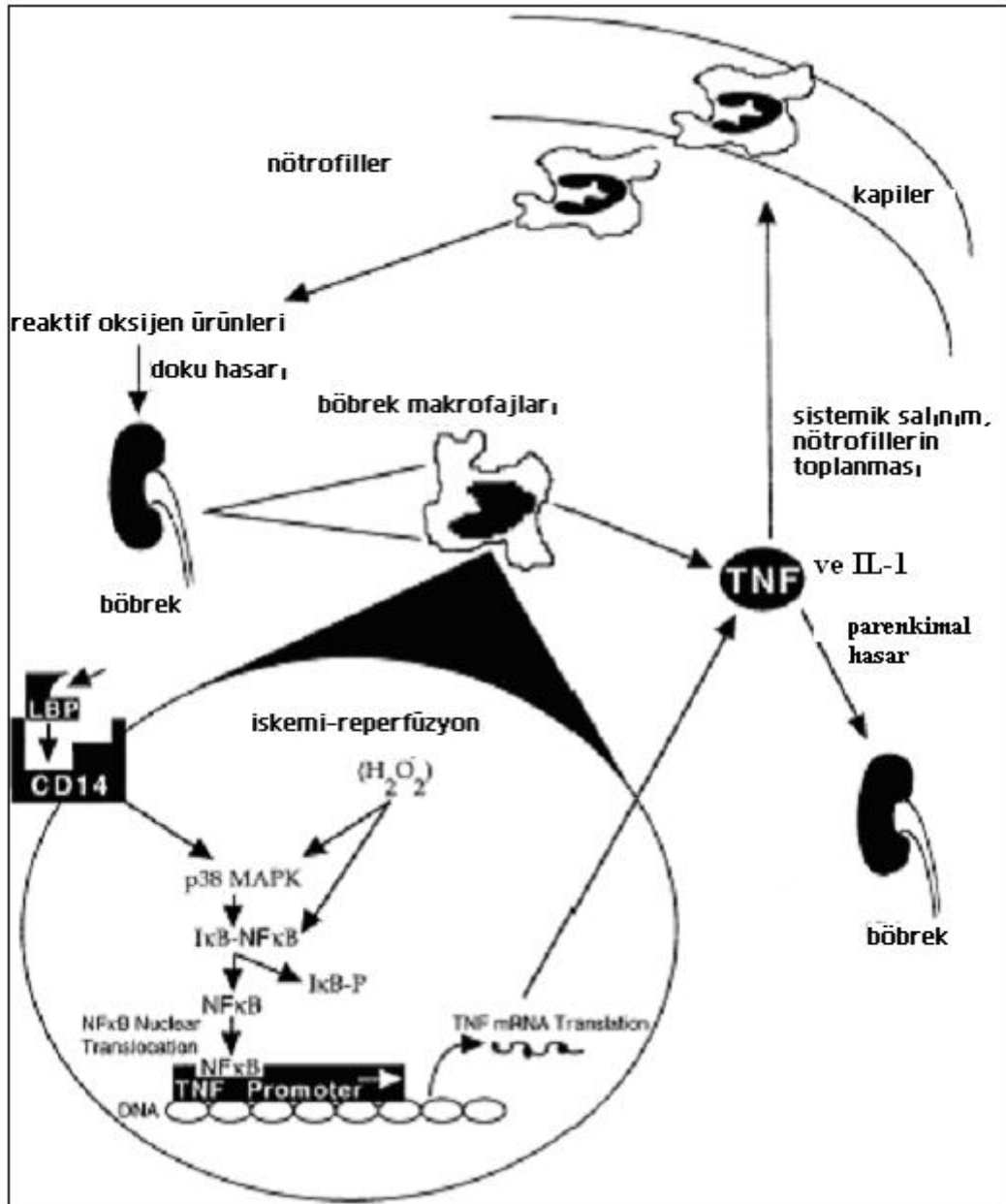
1.1.2.2. Reperfüzyon Fazı:

İskemi reperfüzyon hasarı sürecinde dokudaki ana hasarın reperfüzyon fazı sırasında olduğu kabul edilmektedir. Bu fazda reperfüzyon, yani iskemi sonrası aniden artmış kan akımına bağlı süperoksit iyonları, hidrojen peroksit, ve hipoklorik asit gibi serbest oksijen radikal yapımı artarak oksidatif hasar iyice belirginleşmektedir. Paller ve ark. (1984) süperoksit dismutaz enziminin reperfüzyon hasarı sırasında ortamda bulunmasının I/R hasarını büyük ölçüde engelleyebildiğini göstererek oksidatif hasarın özellikle reperfüzyon fazında önem taşıdığını vurgulamışlardır. Daha sonraki yıllarda ROS yakalayıcıları olan glutatyon ve desferoksamin, allopurinol gibi ksantin oksidaz inhibitörleri ile yapılan çalışmaların sonuçları da Paller ve ark. (1984) görüşünü desteklemiştir. Toksik oksijen radikalleri; dokuda parenkimal hücreler, vasküler endotel, nötrofiller, makrofajlar gibi pek çok hücre tarafından sentezlenebilmektedir.

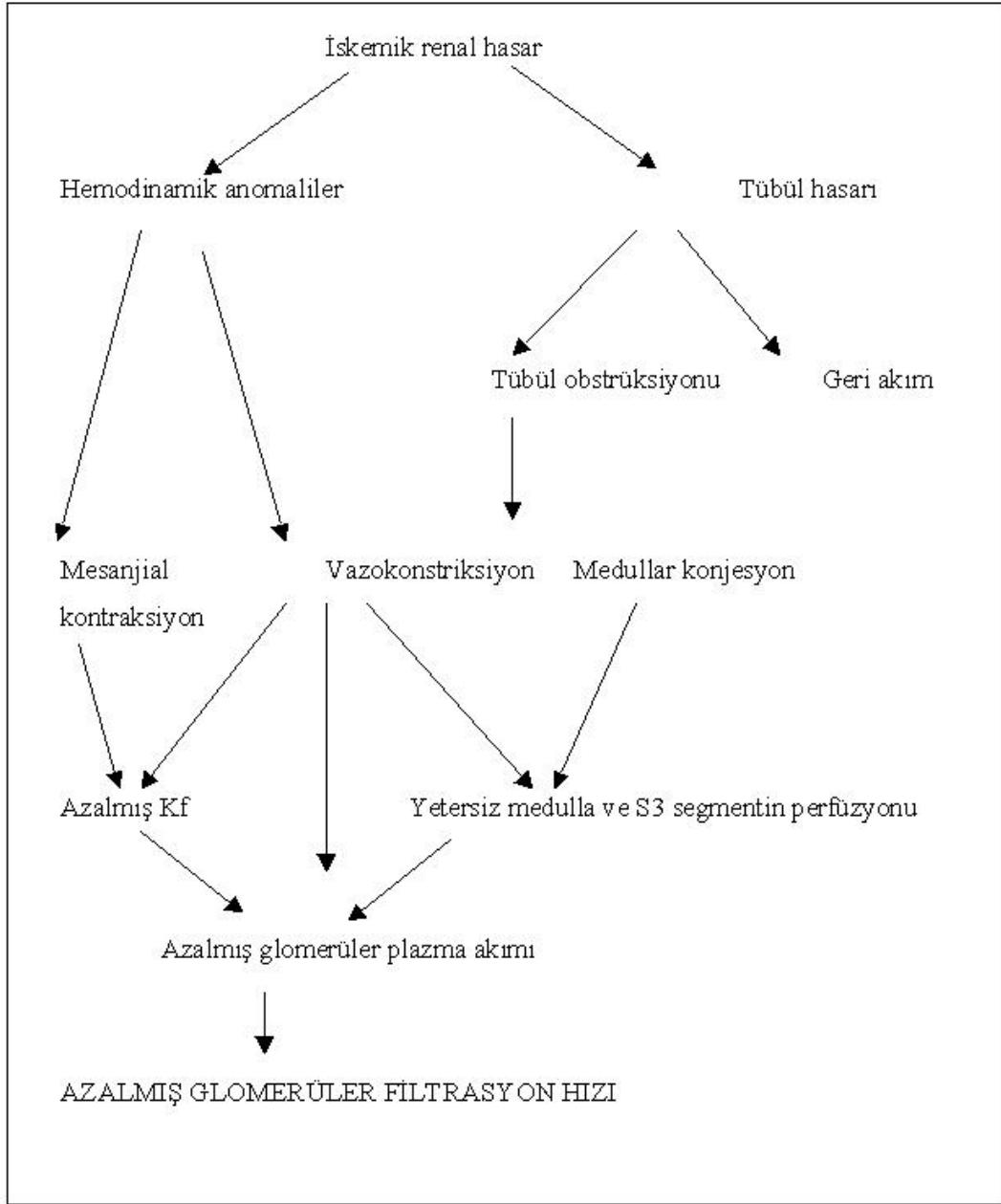
Dokuda oksijen miktarı azaldığında başlayan ROS yapımı reperfüzyon sürecinde ortamda oksijen radikallerinin artmasıyla daha da artar. Mitokondrinin normal metabolizması sırasında da bir miktar oksijen radikal oluşumunun devam ettiği görülmüştür, fakat iskemi sırasında azalmış ATP' ye bağlı olarak mitokondrinin iş yükü artmakta ve ROS üretimi de hızlanmaktadır. Reperfüzyon sırasında ise iskemi sırasında ortaya çıkan ROS radikalleri farklı toksik radikallere dönüşerek hasar iyice belirginleşir. Buna en belirgin örnek toksik radikal kaynağı olan ksantin dehidrojenazın iskemik süreçte ksantin oksidaza dönüşümü, reperfüzyon sırasında ise süperoksit iyonun açığa çıkmasıyla beraber hipoksantin ksantin oluşumudur (Droge, 2002, Facundo ve ark., 2007).

Polimorfonükleer (PMN) hücreler ve makrofajlar myeloperoksidaz (MPO) ve NADPH oksidaz yoluyla ROS üretebilirler. PMN hücreler ve makrofajlar aktive olduklarında gerek inflamatuvar sitokin üretimi ile gerekse artan ROS üretimiyle I/R hasarını artırırlar.

Vasküler geçirgenliğin artmasıyla dokuya sızan PMN hücre sayısı ve aktivasyonu artar. Doku makrofajları da aktive olur. Ortama sitokin salınımı başlar; proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β salınır. Ortamdaki TNF- α ; NFkb yolunu uyarır, ayrıca hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerini de aktive ederek hücrede apoptosisi başlatır. I/R hasarı sırasında doku makrofajlarının da iskemiye maruz kalmasıyla TNF- α salınımını uyarıcı genler aktive olur. Böylece hem endojen doku makrofajlarının etkisiyle hem de vasküler konjesyonla ortama gelen PMN hücreler ve monositlerle sitokin yapımı uyarılır ve salınımı artar (Donnahoo, 1999; Şekil 1.4).



Şekil 1.4: Renal I/R hasarına sitokinlerin ve inflamatuvar sürecin katılımı (Donnahoo, 1999).



Şekil 1.5: Renal iskemi sonrası renal hemodinamideki değişimler. I/R hasarı sonucunda oluşan hücresel hasar böbrek hemodinamiğine ve fonksiyonlarına yansır. İskemi sırasında renal kan akımı azalarak medüllaya perfüzyon azalır ve tübüler hasarlanma oluşur. Mezanjial kontraksiyon glomerüler kan akımının daha da azalmasına neden olur. Reperfüzyonla beraber aşırı kan akımıyla ortamdaki ROS artar ve hasar iyice belirginleşir (Atlas of Kidney Diseases).

1.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında K-ATP Kanallarının Rolü:

1.1.3.1. K Kanalları:

K⁺ kanalları, hem bitki hem de hayvan hücrelerinde yaygın olarak bulunurlar ve çok önemli fonksiyonları kontrol ederler. K⁺ kanalları, membran potansiyelini belirler, uyarılabilen hücrelerde elektriksel uyarımların oluşmasını sağlar, hücre hacim ve hareketini kontrol ederler. Renal tübül epitel hücrelerinde K⁺ kanalları sadece hücre negatif potansiyelinin ve hücre volümünün düzenlenmesi gibi ana fonksiyonları düzenlemenin yanısıra böbreklerde K⁺ sekresyonunda da önem taşır. Glomerüler sirkülasyonda vasküler tonun düzenlenmesinde ve tübüloglomerüler feedback mekanizmalarına da katılır. Son dönemlerde renal K⁺ kanallarıyla ilgili çok sayıda çalışmada bu kanalların biyofiziksel özellikleri, regülasyonu, moleküler yapıları ortaya konmuştur (Jenkinson , 2006).

K⁺ Kanallarının Tipleri:

1. Voltaj kapılı K⁺ kanalları (K_v): Büyük çoğunluğu yavaş ve gecikmiş aktivasyon gösterir.

2. İçeri (inward) rektifiye K⁺ kanalları (k_{ir}) : Genel olarak K⁺ u içeri alma eğilimindedirler. K_{ir} kanallarının aktivitesi, çoğunlukla, fosfotidilinozitol 4,5-bifosfat (PIP₂)' a bağlıdır. Hücre uyarımında önemlidirler ve hücre dinlenim potansiyelinin devamını sağlarlar (MacKinnon, 2003).

1.1.3.2. Böbrekte K⁺ Kanallarının Fizyolojik Rollerini: K⁺ Homeostazına Renal K⁺ Transportunun Katılımı:

Vücudun K⁺ dengesi intrasellüler ve ekstrasellüler sıvıdaki eşit olmayan K⁺ dağılımının devamına ve renal K⁺ atılımına bağlıdır. Ekstrasellüler sıvıdaki düşük

konsantrasyonlu K^+ havuzunun dengede olması çok önemlidir. Renal K^+ atılımı; glomerülden K^+ un serbest klerensi, proksimal nefronlardan yoğun geri absorpsiyonu ve distal nefronlardan kontrollü sekresyonunu ile düzenlenir. K^+ eksikliğinde distal segmentten de K^+ geri emilimi olabilmektedir.

K^+ kanalları; net K^+ sekresyon ve absorpsiyonunun düzenlenmesinin yanısıra hücre membran negatif potansiyelinin devamını da sağlar. Bu şekilde dinlenim potansiyeli sağlanarak elektrojenik transport olayları kolaylaşır; tübül boyunca büyük miktarlarda anyonun dışarı, katyonun ise içeri akımları sırasında membran potansiyeli dengede kalır. Herhangi bir nedene bağlı olarak gelişen hücrede şişmeyi takiben hücre hacminin yeniden düzenlenebilmesini sağlar. $Na^+-K^+-2Cl^-$ kotransporter ile uzun inen tübüle (TAL) geçen K^+ nin tübül sıvısına geri dönmesini sağlar ve basolateral membrandaki $Na^+-K^+-ATPase$ etkilerine katılır (Herrera ve ark., 2006). Pek çok K^+ kanalının moleküler yapısı tanımlanmış olsa da nefron boyunca yerleşimleri ve renal epiteldeki fonksiyonları hakkında ileri çalışmalar gereklidir.

$K-ATP$ kanalları; böbrekte proksimal tübül, henlenin kalın çıkan kolu, kortikal toplayıcı kanal hücrelerinde bulunmaktadır. Bu bölgeler aynı zamanda böbrekte kan oksijen düzeyinin de değerlendirildiği bölgelerdir. İntrasellüler ATP konsantrasyonunda düşme bu hücrelerde $K-ATP$ kanallarının açılmasına neden olmaktadır (Jenkinson , 2006, Patel ve Honore 2001, Hebert ve ark., 2005).

Kalpte yapılan çalışmaların aksine $K-ATP$ kanallarının böbrekteki etkisine ilişkin çalışmaların sonuçları çelişkilidir. İskemi sırasında $K-ATP$ kanallarında aktivasyon sonrası renal K^+ atılımında değişiklik olmadığı gözlenmiştir. $K-ATP$ kanalları nötrofillerde de yoğun olarak bulunmaktadır. Glibenklamid genel $K-ATP$ kanal inhibitör etkisi olan oral hipoglisemik ajandır. Glibenklamidin (20 mg/kg) renal iskemi-reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkisinin de gene $K-ATP$ kanalları üzerinden inflamatuvar hücre aktivasyonunun inhibisyonu ve sitokin yapımının azalması şeklinde açıklanmaktadır (Pompermayer, 2005).

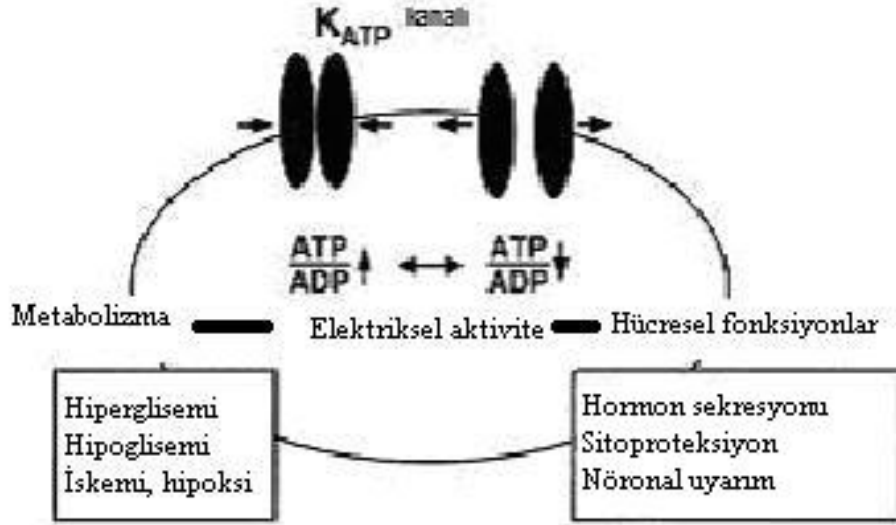
1.1.3.4. Mitokondriyal K-ATP Kanalları:

Intrasellüler membranların tümünde olduğu gibi mitokondriyal membranlarda da porin, katyon ve anyon selektif kanallar bulunmaktadır (MacKinnon, 2003). Mitokondriyal iyon kanalları eksositoz, sinaptik iletim gibi önemli olaylarda rol almaktadırlar (Jonas, 2004). Bir çok çalışma mitokondriyal iyon kanallarının iskemik önşartlanmada da önemli katkılara sahip olabileceğini göstermiştir (Hanley ve Daut, 2005).

K-ATP kanalları ilk olarak kalpte tanımlanmıştır, daha sonra başta pankreatik hücreler, beyin, böbrek, düz kas ve iskelet kası olmak üzere pek çok hücre ve dokuda yaygın olarak bulunduğu gözlenmiştir. Farmakolojik profil belirlemeye yönelik olarak yapılan pek çok çalışma ve immünfloresans çalışmalar mitokondriyal K-ATP (mitoK_{ATP}) kanallarının içeri rektifiye K⁺ (Kir 6x) kanal ailesinden olduğunu düşündürmektedir. mitoK_{ATP} kanallarının dual fizyolojik rolleri olduğu ileri sürülmektedir (Szewczyk, 1998). İlk olarak bu kanallar K⁺ homeostazını devam ettirmekte ve bu şekilde mitokondriyal volüm de kontrol edilmektedir (Halestrap, 1994). İkinci olarak K⁺ alımı ile mitokondrinin enerji kullanımı da elektrik yük transferinin kısmen K⁺ ile karşılanmasıyla proton pompasının yerine geçmekte ve transmembran elektrik potansiyel boyunca pH gradient oluşumu engellenmektedir. (Czyż ve ark., 1995).

K-ATP kanalları, hücrenin metabolik durumuyla kontrol edilen kanallardır (Şekil 1.6). Bu kanallar intrasellüler ATP ile inhibe, MgADP ile aktive olurlar. Bu durum, K-ATP kanallarının hipoksi, iskemi, hipoglisemi gibi metabolik stres durumlarına adaptasyonda önemli rol aldığını düşündürmüştür. Kalpte ve pankreasta bu kanallar yoğun olarak çalışılmıştır. Pankreatik hücrelerde, artmış glukoz konsantrasyonuna bağlı artan ATP düzeyi ile K-ATP kanalları kapanır. Hücre membranı depolarize olur ve voltaj bağımlı Ca kanalları açılır, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar. Hücrelerden insulin sekresyonu sağlanır. Talbutamid ve glibenklamid gibi sülfonilürea grubu antidiabetikler K-ATP kanallarını kapatarak

insulin salgısı arttırırlar ve hipoglisemik etki gösterirler. Diazoksit gibi potasyum kanal açıcılar ise insulin salgısını azaltırlar (Tang ve ark., 2004).



Şekil 1.6: K-ATP kanallarının hücrede metabolik dengeye katılımı: Hücrede K-ATP kanallarının aktivasyonu; hücre içi ATP/ADP, glukoz ve O₂ konsantrasyonlarına bağlı olarak düzenlenir. Bu kanalların aktivasyonu hormon sekresyonu, kaslarda aktivasyon, nöronlarda eksitasyon, ve hücrede koruyucu etki ile sonuçlanabilir (Tang ve ark., 2004).

K-ATP kanallarının glukoz ve insulin dengesindeki rolünün yanısıra metabolik stres sırasında hücresel fonksiyonları da düzenlediği görülmüştür. Bu konuda ilk çalışmalar kardiyovasküler sistemde yapılmıştır. Kalpte , K-ATP kanalları K⁺ dış akımı ve aksiyon potansiyelinin kısılmasında rol alır. Her iki durum da elektrofizyolojik bozukluklara neden olarak aritmilere yol açar (Bouchard, 2004).

Shi ve ark. (2004), izole kalp modelinde EPO' nun myokardial iskemiden koruyucu etkisinde MAP kinaz, PK C ve K- ATP kanallarının rol aldığını göstermişlerdir. K- ATP kanalları içeri rektifiye- Kir 6-x ailesindedir ve hücrede pek çok organelde bulunmaktadır. Mitokondriyal ve sarkolemma ise en çok bulunduğu yerlerdir.

PK C, önşartlanmanın oluşumunda ve devamında önemli rol alır. Myositlerin PKC aktivatörü phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)'a maruz kalmasının diazoksitin etkilerini güçlendirdiği ve bu etkileri mitoK_{ATP} channel blokerü 5-hydroxydecanoate (5-HD) nin inhibe ettiği gözlenmiştir (Sato ve ark. 1998). PK C δ-isoformun aktivasyonu mitoK_{ATP} kanal ın katıldığı önşartlanmada önem taşımaktadır. mitoK_{ATP} kanal blokörü olan 5-HD, PK C inhibitörleri olan chelerythrine veya calphostin C kullanımı, diazoksitin iskemi-reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkisini tamamen bloke edebilmektedir (Wang ve ark., 1999).

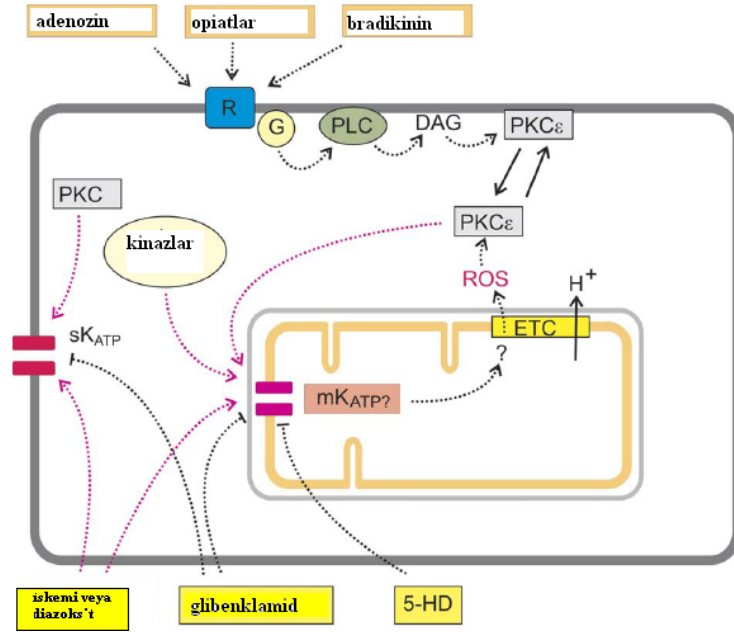
Başka bir çalışmada mitoK_{ATP} kanalları ve PK C sinyal iletimi ve adenosin A1 reseptörleri arasındaki ilişki araştırılmıştır (Miura ve Tsuchida, 1999). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda mitoK_{ATP} kanallarının, PK C aktivasyonunun devamı olduğu, Adenosin A1 ile enfarkt alanının sınırlandırılmasında rol aldığı gözlenmiştir. Enfarkt alanında iskemiye tolerans artmakta ve iskemik hasardan mitokondriyal fonksiyonların korunması sağlanmaktadır .

Son dönemlerde, iskemik önşartlanmanın; aktin sitoskeleton ve mitoK_{ATP} kanal arasındaki etkileşimle olduğu düşünülmektedir. Diazoksitin iskemi öncesi verilmesinin koruyucu olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde anisomycin, (p38/JNK aktivator), enfarkt alanını azaltmakta, hem diazoksit hem de anisomycinin koruyucu etkisi 5-HD ile bloke edilebilmektedir. İlginç olarak, diazoksit veya pinacidil ile önşartlanma sonucunda elde edilen koruyucu etki; cytochalasin D kullanılarak hücre iskeletinin bozulmasıyla azalmaktadır. Bu sonuçlar, hem mitoK_{ATP} kanalı hem de hücre iskelet proteini aktinin önşartlanma ile koruyuculukta rol aldığını göstermektedir (Baines ve ark., 1999).

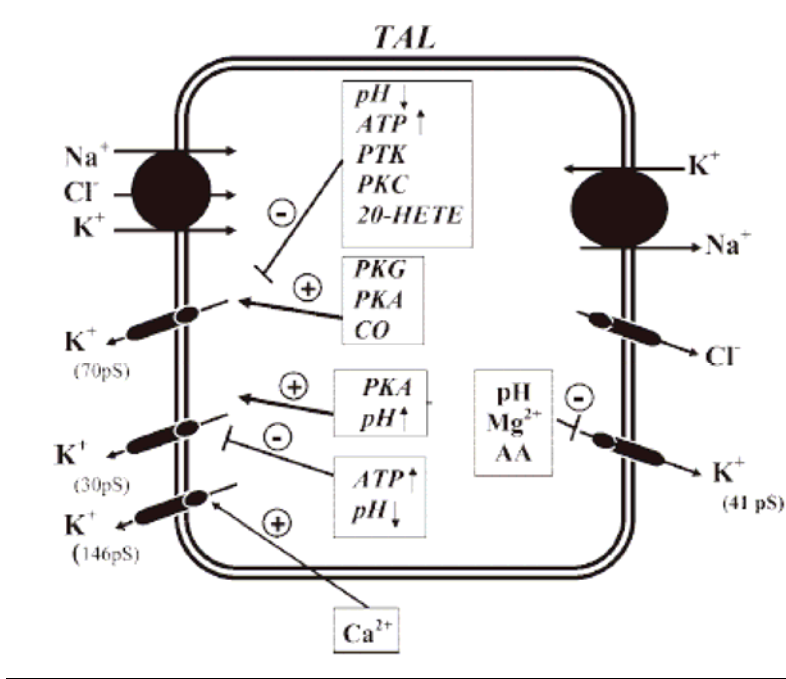
Uzun süreli iskemide sıçan kalbinde mitokondriyal fonksiyonlarının korunmasında diazoksitin rol aldığı gözlenmiştir. Hipoksi, mitokondriyal oksijen tüketiminde yaklaşık %40 lık azalmaya neden olmaktadır. Bu etki, glibenklamid ve 5- HD ile azaltılabilmektedir. (Iwai ve ark., 2000).

mitoK_{ATP} kanalların nitrik oksitle etkileşimi de çalışılmıştır (Sasaki ve ark., 2000). NO donörü S-nitros-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) , mitokondriyal matriksi doza bağımlı olarak okside etmektedir. Bu etkileşim sırasında plazma

membran K_{ATP} aktive olmamaktadır. SNAP-ile uyarılmış oksidasyon 5-HD ve NO yakalayıcılar ile bloke edilebilmektedir. NO doğrudan mito K_{ATP} kanallarını aktive etmekte ve diazoksitin etkisini arttırmaktadır. Diazoksit erken ve gecikmiş anti-iskemik etkide rol almaktadır. Her iki etkinin de NO bağımlı olduğu bilinmektedir (Ockaili ve ark., 1999).



Şekil 1.7: K-ATPkanallarının regülasyonu: MgADP, PIP2 artması, protein kinaz A ve C aktivasyonu, insulin, pH ve pO₂ azalması, bradikinin, adenosin K-ATPkanallarını aktive ederken; ATP, sülfonilürea, anjiotensin II, endotelin, vazopressin, kalsionörin ve artan pO₂ inhibe eder. Hücre içinde artan ROS a bağlı Protein kinaz C aktivasyonu ile de dolaylı yoldan K kanal aktivasyonu olmaktadır (Hanley ve Daut, 2005).



Şekil 1.8: Böbrekte tübüler hücrelerde K kanallarının katıldığı olaylar: Çıkan kalın tübülde luminal Na-K-Cl kotransporter ve bazolateral Na-K-ATPazların regülasyonu görülmektedir. 20-HETE –20-hidroksi eikozatetranoid asit, PKC: protein kinaz C, PKA: protein kinaz A, PKG: cGMP bağımlı protein kinaz, PTK: protein tirozin kinaz, CO: karbon monoksit, AA: arakidonik asit (Patel ve Honore 2001).

1. 1. 4. İskemi Reperfüzyon Hasarına Proinflamatuvar Sitokinlerin Katılımı:

Böbrekte I/R hasarı, belirgin lökosit infiltrasyonunun eşlik ettiği tübüler epitel nekrozu veya apoptozisiyle karakterize bir durumdur. Endotel fonksiyon bozukluğunu ve hasarlanmasını takiben lökosit infiltrasyonu artarak devam eder. TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-2, IFN- γ , granulosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi pro-inflamatuvar maddelerin yapımı ve salınımı artar. Ortamda artmış olan sitokinlerin etkisiyle intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-

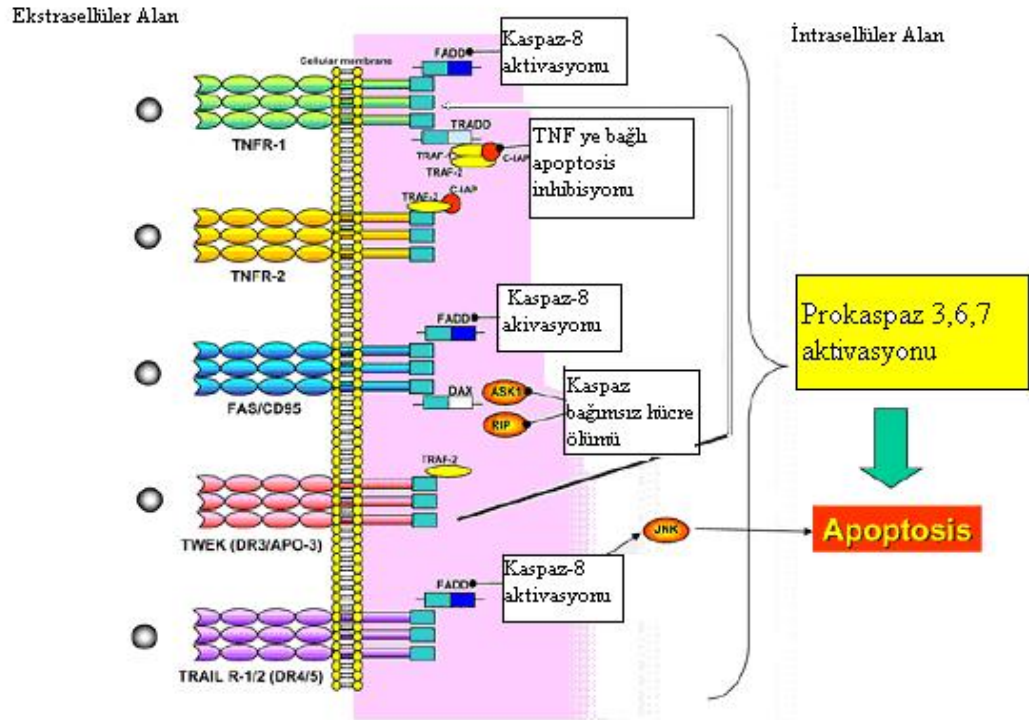
1) gibi adezyon molekülleri ve kemokinler hasarlanmış organdan salınmaya başlar. Lökosit adezyon molekülleri; lökositin adezyonu, migrasyonu gibi lökosit-endotel etkileşimi açısından çok önemlidir. Ortamda inflamasyon yoksa lökositler nadiren endotele yapışırlar. Renal I/R hasarında IL-1 β miktarı artsa da IL-1 β reseptör knockout farelerde iskemi reperfüzyon hasarının azalmadığı görülmüştür (Donnahoo,1999).

TNF- α ; glomeruler kan akımını ve glomeruler filtrasyon hızını azaltır ve diğer proinflamatuvar mediyatörlerin salınımını artırır, glomerüler albümin geçirgenliğini artırır. TNF- α , mesenjiyal hücreleri uyarak trombosit aktive edici faktör, endotelin-1, prostaglandinler gibi vazokonstriktif ve adenosin, nitrik oksit prostasiklin gibi vazodilatör moleküllerin salınımına neden olur. TNF- α , IL-1 β gibi diğer endojen pirojenleri de salgılatır, reaktif oksijen ürünlerinin yapımını artırır. Bu sitokinlerin salınımının artması, sadece lokal değil sistemik reaksiyonların da başlamasına neden olarak uzak organlarda da inflamatuvar sürecin başlamasına neden olabilir. Bu moleküller ve ürünler inflamatuvar gen ekspresyonlarının artmasına yol açarak inflamatuvar sürecin ilerlemesine ve yayılmasına neden olurlar (Lien ve ark., 2003, Donnahoo,1999) (Şekil 1.9).

Renal I/R hasarında inflamatuvar sitokin yapımının artmasına 3 ana mekanizma aracılık eder:

1. Hüresel ATP miktarının azalması, ATP bağımlı transport sistemlerinin inhibisyonuna neden olur. Hücrede iyon dengesinin bozulmasıyla beraber hem hücre hem de mitokondriyal membran hasarı da oluşmaya başlar. Mitokondriden intermembran proteinler salınmaya başlar. Sitokrom C salınımı ile bir dizi hücre içi kaskad aktive olur ki bu durum aynı zamanda hücrede apoptozisin başlaması anlamına gelmektedir. Ortama çıkan kaspaz 1-9 inaktive durumda bulunan IL-1 β ' nın da aktivasyonunu sağlar (Donnahoo,1999,Yang, 2005).

2. Hipoksi ile uyarılabilen faktör-1 (HIF-1): HIF-1 hücrede oksijenin azalmasıyla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 normoksi sırasında stabil değildir ve pO_2 ' ye duyarlı olarak yıkılan bir parçaya sahiptir. İskemik inflamatuvar süreçte TNF- α ve IL-1 β ' nin sadece hücrelerde apoptosis doğrudan uyararak kalmayıp aynı zamanda ortamda sentezi artmış olan HIF-1' in hipoksi sırasında renal tübüler hücrelere bağlanmasını daha da arttırdığı ve takiben bu hücrelerde inflamatuvar sürece öncülük ettiği gözlenmiştir (Sandau,2001).
3. İskemi reperfüzyon hasarı sırasında açığa çıkan hidrojen peroksitinin (H_2O_2) de hücrelerde doğrudan p38 MAPK yolunu uyararak inflamasyonu aktive ettiği gözlenmiştir (Khadaroo, 2003).



Şekil 2.9: TNF ve diğer proinflamatuvar sitokinler hücre yüzeyinde bulunan reseptörleri aktive ederek eksternal apoptotik süreci başlatırlar, bu süreç kaspaz bağımlı veya bağımsız olabilir (Lopez-Neblina ve ark., 2005).

1.1.5. Önşartlanma Mekanizmaları

İskemik önşartlanma; dokunun iskemi-reperfüzyon hasarına karşı toleransının sublethal I/R atakları ile sağlanmasıdır. Önşartlanma ilk kez 1986’ da Murray ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Köpek kalbinde sol sirkümfleks arteri 40 dk okluze ederek uzun süreli iskemik hasar oluşturduklarında önşartlanma yapılmış hayvanlarda oluşan hasarın yapılmayanlarda görülen hasarın sadece %25’ i kadar olduğunu bulmuşlardır.

Önşartlanma 2 aşamadan oluşmaktadır.

1. Erken önşartlanma dönemi: İlk 3 saatteki evredir.
2. Geç önşartlanma dönemi: İskemiye takiben 12-72 saatlik evredir.

İskemik önşartlanmada yer aldığı bilinen pek çok mekanizma ve molekül mevcuttur; adenosin, asetil kolin, bradikinin, liposakkarid (LPS), opioidler, nitrik oksit vs bunlardan sadece bir kaçıdır. Aslında bu moleküller ve mekanizmaları hücre içinde aktive olduklarından primer aktivasyonun kaynağını birbirinden ayırtetmek zordur. Sonuçta farklı başlıyor gibi görünen mekanizmalar benzer sinyal yollarını aktive ederek etki göstermektedir. Örneğin asetil kolin, LPS, bradikinin nitrik oksit üzerinden etki gösterir. LPS; uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) yapımı için güçlü bir uyarıcı iken diğerleri yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS) aktivasyonu yaparlar. Bu cNOS öncelikle endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) formdadır ve ilk kez 1986 da Furchgott tarafından endotelden köken alan gevşetici faktör olarak tanımlanmıştır. Pek çok kardiyovasküler hastalıkta, aterosklerozda, hipertansiyon fizyopatolojisinde önemli role sahiptir. Bu hastalık süreçleri dışında hücresel hasar ve hatta normal hücre homeostazından da önemlidir. Tabloda iskemik önşartlanmada yer alan moleküller ve etki yolları verilmiştir (Devarajan, 2006) (Tablo 1. 3)

Tablo 2.3: İskemik önşartlanmada rol alan mediatörler ve etki mekanizmaları (Downey, 2007, Bake, 2005, Miura, 1999, Rundback, 2002,McMicheal, 2004).

Mediatör	Mekanizması
Adenosin	Adenosin A2 reseptör aktivasyonu ve takiben PK C ve tirozin kinaz ileti yolu
Asetil kolin	Protein kinaz aktivasyonu
Opioidler –örn morfin	S opioid reseptör aktivasyonu (Gi/o protein aracılı)
Norepinefrin	α adrenerjik reseptör aracılı protein kinaz aktivasyonu
Nitrik oksit	K-ATPkanal aktivasyonu
Serotonin	bilinmiyor
Sitokinler (IL-1 β , IL-2, TNF) İnterferon (IFN)	iNOS aktivasyonu
Reaktif oksijen ürünleri	iNOS aktivasyonu
LPS	Isı şok protein 60 (HSP 60) ekspresyonu artışı iNOS aktivasyonu c-jun, c-fos mRNA ekspresyon artışı katalaz ve Mn içeren süperoksid dizmutaz enzim mRNA ekspresyon artışı
Monophosphoryl lipid A (MLA)	LPS ile aynı mekanizmalar
Farmakolojik ajanlar	
K kanal açıcılar	K-ATP kanallarını doğrudan açmaktadır.

Her ne kadar önşartlanma ile ilgili pek çok mekanizma öne sürülse de hala bunlara yenileri eklenmeye devam etmektedir, ama genel olarak çalışmalardan elde edilen sonuçlar nitrik oksitin rolü ile K_{ATP} kanallarının açılmasını işaret etmektedir. Bu durum hem erken hem geç önşartlanma için de aynıdır. NO yapım artışı daha çok iNOS üzerinden gelişmekte ve NFkb uyarımıyla devam etmektedir. Dual etkisi olan NFkb duruma göre iNOS sentezini azaltarak veya arttırarak iNOS miktarını düzenlemektedir (Sasaki, 2000, Chuanyu, 2002, Li, 2004).

HIF ve EPO uyarımı ve yapımı da iskemiye cevap olarak aktive olan ilk genler ve yapımı artan ilk moleküllerdir. Bu nedenle önşartlanmada çok önem taşıyan moleküller olarak kabul edilmektedirler (Semenza, 2006).

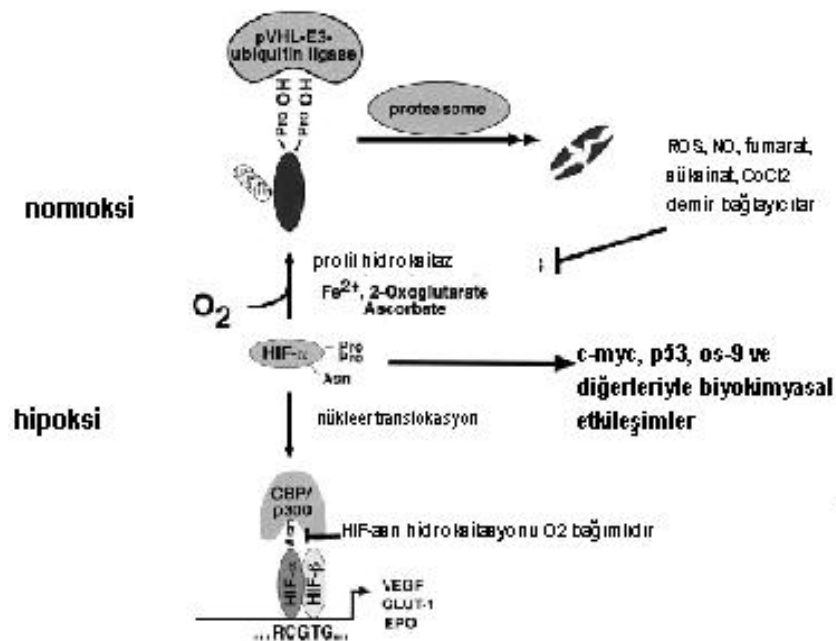
1.1.5.1. Hipoksi ile Uyarılabilen Faktör (HIF)

Hipoksi veya düşük O₂ düzeyleri pek çok patolojik süreçte ortaya çıkabilir ve farklı hücreyel olayları, doku ve sistemik yanıtları uyarır. Iskemiden ilk olarak ve en çok endotel hücreleri etkilenir. Iskeminin düzeyine göre hasar boyutu da değişir, vasküler yapı bozulur, permeabilite artar, ödem gelişir. Hipoksi sırasında pek çok gen aktive olur, fakat hipoksida aktive olan ilk ve en önemli gen HIF-1' dir. Hücreyel farklılaşmada rol alan pek çok gen doğrudan veya dolaylı olarak hipoksida aktive olur. Bunlardan başlıcaları; EPO, laktik dehidrojenaz A -LDH-A, endotelin-1, transferin, transferin reseptör, VEGF, flk-1, flt-1, trombosit köken alan büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve glikolitik yoldaki genlerdir (Lee ve ark., 2004, Semenza, 2002, Wenger, 2002, Haase, 2006).

Doku hipoksisi sadece patolojik koşullarda oluşan bir durum değildir, bu nedenle HIF-1 normal embryo gelişim sürecinde de kritik bir moleküldür. HIF-1 ve 2 oksijene hassas, oksijen salınımını ve hücrenin oksijen yetersizliğine adaptasyonunu düzenleyen biyolojik süreçleri kontrol eden transkripsiyon faktörleridir. HIF-1; oksijen düzeyine hassas bir α alt biriminden ve yapısal olarak eksprese edilen bir β alt biriminden oluşur. HIF-1 β ; enerji metabolizmasına, anjiojeneze, eritropoeze ve demir metabolizmasına, hücre çoğalmasına, apoptosise ve diğer biyolojik süreçlere katılan genlerin ekspresyonunu düzenleyen kısımdır. Normal PO₂ koşullarında HIF-1 α hidroksile olur ve Von Hippel Lindau (VHL) E3-ubiquitin ligaz ile parçalanır. Hücrelerde hipoksi oluştuğunda HIF-1 α ; HIF-1 β ile dimerize olarak veya başka proteinlerle etkileşerek stabilize olur ve oksijen sensör mekanizmaların aktivasyonu

devam eder ve takip eden sinyal iletim yollarının aktivasyonu başlar (Semenza, 2004).

HIF-1 ubiquitinle birleşir ve normoksik durumda 5 dk içinde parçalanır. Yayınlarda oksijen düzeyini belirleyen çok sayıda molekülden bahsedilse de hücrelerin oksijen düzeyini ilk olarak nasıl algıladıkları aslında hala açık değildir. PVHL; von Hippel Lindau hastalığından sorumlu tümör süpressör genidir ve O₂ sensör sistemde HIF-1 ile birlikte bulunur, HIF-1 in ubiquitin degradasyonuna yardımcı olur. Benzer şekilde, F-box içeren proteinler ubiquitin ligazın substratlarını tanırlar ve onları fosforilasyon bağımlı ubiquitinasyona ve proteozomal degradasyona yönlendirir. F-box proteinler WD40 veya Ser/Thr bağlanma özelliği olan lösinden zengin parçalar içerirler. Ubiquitin ligazlara yardım eden ikinci protein ailesi SOCS-box (suppressor of cytokine signaling proteins) dur. Düşük O₂ (<%5 O₂) konsantrasyonlarında; HIF-1 stabilize olur, ARNT (Ariil hidrokarbon reseptör nükleer translokator protein- HIF-1 β) ile fonksiyonel bir transkripsiyonel faktör kompleksi oluşturur. Bu kompleks oksijen dengesinin ana düzenleyicisidir ve anjiojenez, eritropoez ve glukoz metabolizmasında rol alan gen ağını uyarır (Semenza, 2004, Wenger, 2002).



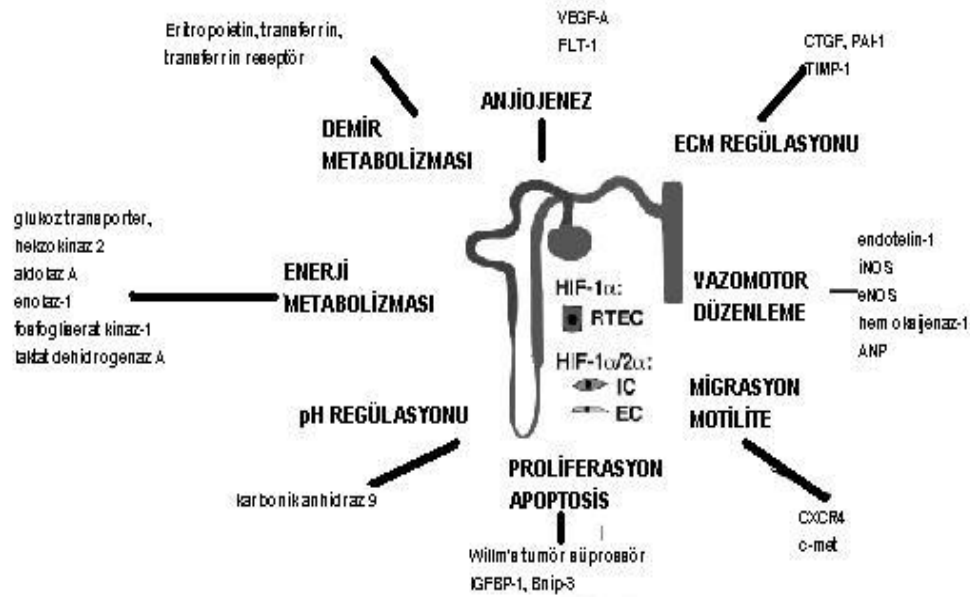
Şekil 1.10: Hipoksik uyarıya bağlı HIF aktivasyonu: Normoksida HIF VHL-E3-ubiquitin kompleksi ile degrade olurken; hipoksi durumunda prolyl hidroksilazlar inaktiftir ve HIF degradasyonu inhibe olur. HIF'ın hedefi olan EPO, VEGF, glukoz transport-1 (GLUT-1) genlerinin ekspresyonu artar (Semenza, 2004).

Aktif durumdaki HIF; c-Myc, P53 gibi genlerle de biyokimyasal reaksiyona girer. Nitrik oksit, reaktif oksijen ürünleri, süksinat, fumarat gibi Krebs siklusu metabolitleri, kobalt ve desferoksamin gibi demir bağlayıcılar HIF prolyl-4-hidroksilazı inhibe ederler (Semenza, 2004, Ratcliffe ve ark., 1999).

Hipoksik aktivasyon dışında nitrik oksit, TNF- α , IL-1B, angiotensin II ve epidermal büyüme faktörü (EGF), insulin, insulin benzeri büyüme faktörleri de HIF aktivitesinde artışa neden olurlar. Nitrik oksit, ROS, v-Src ve aktive Ras HIF aktivasyonunu inhibe eder (Ebert ve Bunn, 1999).

HIF-1 α ; hemen hemen her hücrede eksprese olurken; HIF-2 α ; hepatositlerde, renal interstisyel fibroblast benzeri hücrelerde, kardiyomyositlerde, glial hücrelerde, tip II pnömositlerde ve endotel hücrelerinde eksprese olmaktadır (Haasse, 2006).

HIF ile regüle olan genlerin sayısı konuya ilişkin araştırmalar giderek arttıkça daha da yükselmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, çok sayıda molekülün ekspresyonu HIF bağımlıdır. HIF'ın hücrel olaylara katılımı farklı koşullara göre değişiklik göstermektedir. Glukoz ve enerji metabolizması, anjiojenez, eritropoiez, demir homeostazı, hücre migrasyonu, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde yer alan moleküllerin regülasyonunda HIF çok önemlidir. Heme oksijenaz (HO-1), VEGF, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1); doku metalloproteinaz-1 inhibitörü (TIMP-1), konnektif doku büyüme faktörü (CTGF), EPO, Wilms tümör süpresör geni gibi doğrudan HIF ile aktive olan genler mevcuttur. HIF akut ve kronik renal yetmezlik patogeneğinde yer almaktadır (Ratcliffe ve ark., 1999).



Şekil 1.11: Böbrekte HIF bağımlı aktive olan genler: HIF-1 renal hücrelerin çoğunda eksprese olurken, HIF-2 , endotel hücreleri ve renal interstitial fibroblast benzeri hücrelerde eksprese olmaktadır. HIF-1, papillar ve iç medullar interstitial ve endotel hücrelerinde de eksprese olurken dış medulla ve korteksin interstisyel ve endotel hücrelerinde eksprese olmaz. ANP; atrial natriüretik faktör; Bnip-3, BCL2/adenovirus E1B 19-kDa- protein 3 (proapoptotik BH3 domain; sadece BCL-2 ailesi üyesi); c-Met, SF/HGF hepatosit büyüme faktörü için tirozin kinaz reseptörü ; CXCR4, kemokin reseptörü 4; CTGF, konnektif doku büyüme faktörü; EC, endotel hücreleri; ECM, ekstraselüler matris; eNOS, endoteliyal nitrik oksit sentaz; FLT-1, fetal karaciğer tirozin kinaz-1 (VEGF reseptor-1); IC, interstisyel hücre; IGFBP-1, insulin büyüme faktör bağlayan protein-1; iNOS, uyarılabilir nitrik oksit sentaz; PAI-1, plazminojen aktivator inhibitör-1; RTEC, renal tübular epitel hücresi; TIMP-1, metalloproteinaz-1 in doku inhibitörü (Haasse, 2006)

HIF; embriyo gelişimi sırasında nefrojenezde de önem taşımaktadır. HIF veya VHL gen knockout farelerde renal gelişimin tamamlanamadığı gösterilmiştir.

Akut ve kronik renal hipokside rolü olan devreye giren en önemli mekanizma HIF ile ilgidir. Akut hipokside renal tübüler hücrelerde HIF parçalanması durur. HIF aktivasyonu devam eden hipoksik hücrelerde glukoz metabolizmasının devam ettiği gözlenmiştir. Akut hipokside HIF sonrası HO-1, EPO ve VEGF ekspresyonlarındaki artış belirgindir. Kronik hipokside ise HIF etkisi koruyucu olmaktan uzaklaşarak renal patoloji gelişimini tetikleyici ve arttırıcı rol alabilmektedir (Stockmann ve Fandrey, 2006) .

HIF' a bağlı kronik iskemide 3 yol aktive olur: (1) Fibroziz, (2) Matriks proteinlerinde değişim ve (3) İnflamasyonda artış.

1. Fibroziz: Hipoksi, renal epitel hücrelerinde kollajen-1 in yapımını arttırırken matriks metalloprotein-1 in yapımını azaltır. TGF-1 ile sinerjik etki göstererek VEGF, EPO ve endoglin yapımını arttırır. Bunu renal kollajen artışı izler. HIF ın renal fibrojenezde doğrudan rol aldığı gösterilmiştir. SMAD3 ve trombospondin bağımlı TGF aktivasyonunu da arttırarak fibrojeneze katkıda bulunur.

2. Matriks proteinleri arasındaki etkileşime etkisi : HIF; E-kadherinlerin bozulmasına, hücre maktriks adhezyonunda organizasyon bozukluğuna, hücre motilitesinde artışa ve hücre iskeletinde aktinin yeniden organizasyona neden olur. Hücre yapısı değişmeye başlar, mezenkimal belirteç taşıyan fibroblast benzeri hücre sayısı artar, geçiş hücrelerde de artışa neden olur.

3. İnflamasyon: HIF tübülointerstitial hastalıklarda inflamatuvar cevabı düzenleyerek yer almaktadır. HIF-1, myeloid aracılı inflamasyonun başlamasında hücre ATP kullanımını etkiler. HIF-1 inaktive olduğunda myeoid hücre aggregasyonu, motilitesi, invazyonu inhibe olur. Özellikle T lenfosit fonksiyonlarının HIF –1 ile regule olabildiği ileri sürülmektedir (Haasse, 2006).

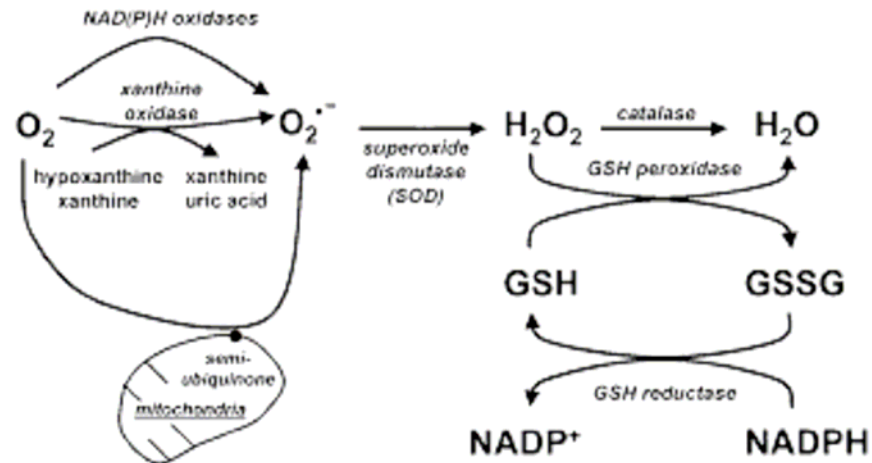
1.1.6. İskemi ve Reperfüzyon Hasarında Oksidatif ve Nitrosatif Stres

Nitrik oksit (NO), oldukça reaktif bir molekül olup güçlü endojen bir vazodilatatördür. Temel olarak kan akımına cevap olarak salınır ve mikrosirkülasyonu dilate durumda tutmaya çalışır. NO; endotel hücrelerinden salınan vazokonstriktör maddelerin etkilerini yok etmeye çalışır, lökositlerin ve trombositlerin adhezyon ve aggregasyonunu bloke eder. NO; heme ve sülfidril grupları içerir, bu gruplara serbest radikallerin bağlanmasıyla NO etkisi bloke olur. I/R hasarında hasarlanmış vasküler alanda oluşan serbest radikaller ile NO inhibe

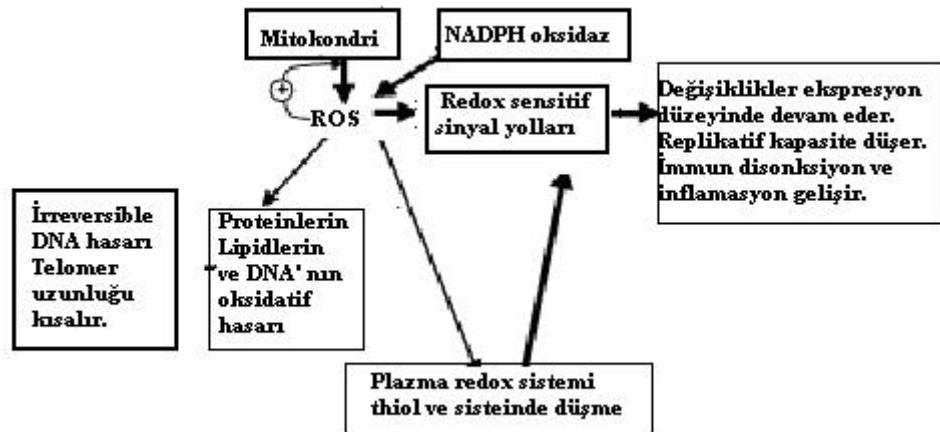
edilir, lökositler adhere olur, vazokonstriksiyon başlar, vasküler permeabilite artar, lokal ödem oluşur.

Düşük doz NO oluşumu I/R hasarından korur. NO donörleri veya L-arjinin kullanımının kardiyak I/R hasarında koruyucu olduğu gözlenirken, renal I/R hasarında NO' nun ve L-arjinin infüzyonunun koruyucu etki göstermediği görülmüştür. iNOS aktivasyonu durumunda inflamatuvar süreç aktive olmaktadır. eNOS un aksine iNOS vazokonstriksiyona neden olur, lökositleri aktive eder. iNOS ve eNOS reperfüzyon hasarında önemlidir. iNOS aşırı aktivasyonu hücrel hasarı artırır (Walker ve ark., 2001).

Reaktif nitrojen metabolitleri (RNM; NO₂, ONOOH, N₂O₃, HNO₂) DNA bazlarının nitrozlanmasına veya deaminasyonuna neden olmaktadır. RNM etkisi ile sitozinden urasil, guanin-den ksantin ve adeninden hipoksantin oluşmaktadır. ONOO- guaninden 8-nitroguanin ve hipoksantin oluşturabilir. 8-nitroguanin DNA yapısı içinde dayanıksız olduğundan spontan olarak depürinasyona uğrar ve abazik alanların oluşmasına neden olur. Oksidasyona uğrayan lipidler de, serbest radikal oluşturarak hücrel makromoleküllere hasar verebilmektedir. Membranın integral veya periferel proteinlerine ve DNA'ya çok yakın mesafede bulunan lipidlerden oluşan lipid alkoksil ve lipid peroksil radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine OH• radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedir (Aust ve Eveleigh, 1999). OH• radikale göre daha düşük reaktiviteye sahip oldukları için hücreler ve dokular arasında taşınabilecek kadar uzun yarı ömürlü olan lipid hidroperoksidler ve karbonil bileşikleri, başlamış olan serbest radikal reaksiyonlarını ilerletme ve oksidatif stresi hücre/dokuda yaygınlaştırma potansiyeline sahiptirler. Ksantin oksidaz, hipoksantin ve ksantin gibi O₂•- radikali oluşturan sistemler ve aktive nötrofiller hücre membranından kolaylıkla diffüze olan H₂O₂ oluşumuna neden olarak hücrelerde yaygın DNA hasarı yapmaktadırlar (Lisa ve ark., 2001, Walker ve ark., 2001, Droge, 2002, Li ve Jackson, 2002).



A



B

Şekil 1.12: Oksidatif enzimler (A) ve artan ROS un etkileri (B) (Droge, 2002)

1.1.7. Eritropoietin

EPO 165 aminoasitten oluşan 30.000 MW ağırlığında glikoprotein yapısında bir hormondur. EPO, yetişkinde primer olarak böbrek peritübüler kapiller yataktaki interstisyel hücrelerden ve karaciğerdeki perivenöz hepatositlerden yapılır; fetusta ise

asıl yapım yeri karaciğerdir. Beyin, üreme sistemi, GIS gibi diğer organlarda da lokal EPO yapımı olduğu görülmüştür. EPO yapımı primer olarak hipoksi ile uyarılır. EPO'nun depolanmaz ve plazma EPO düzeyi aktif hormon düzeyini gösterir (Ebert ve Bunn, 1999, Winearls, 1998).

1.1.7.1. Eritropoietinin Hematopoezde Rolü:

Eritropoez, genel olarak, primitif eritroid öncü hücrelerinin olgun hücrelere dönüştüğü sürekli bir olaydır. IL-3, granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), stem hücre faktör (SCF), IGF-1 gibi bazı hematopoetik büyüme faktörleri de eritropoezi etkiler ama en önemlisi EPO'dur. EPO, primer olarak koloni oluşturan birim eritrosit (CFU-E) hücrelerinin proeritroblastlara dönüşümünü uyarır. Ayrıca hipoksi sürecinde kan EPO düzeyinin yüksek olması sonucunda proeritroblastların farklı eritroblastik evreleri normalden daha hızlı geçmelerine neden olmaktadır. Ayrıca EPO tedavisi gören hastaların eritrositlerinin ömrünün daha kısa olduğu gözlenmiştir. EPO eritroid öncü hücreleri için sadece bir mitojen değil aynı zamanda da yaşamsal faktördür. Eritrositlerin farklılaşmasını kolaylaştırır (Winearls, 1998).

1.1.7.2. Eritropoietin Yapımı:

EPO yapımı plazma EPO düzeyinden bağımsız olarak hipoksiyle uyarılır ve hipoksi varlığında kan eritrosit düzeyinin yüksek olması kan EPO düzeyini tamamen baskılayamamaktadır (Fisher ve Nakashima, 1992). Siyanotik kalp hastalıklarında polisitemi varlığına karşın hipoksi devam ettiği için oldukça yüksek EPO düzeyleri saptanır. Normal şartlarda Hb düzeyi 10,5 %g altına düştüğünde doku hipoksisi başlar EPO yapımı 2-3 kat artar.

Böbrek dokusu EPO'nun primer yapım yeri olduğu için böbrek parenkimal hasarı da EPO düzeyini olumsuz etkileyecektir. Plazma kreatinin düzeyi %1,5 mg

üzerine çıktığı zaman plazma EPO ve Hb arasındaki korrrelasyon bozulur, normal sağlıklı bireylerde Hb düzeyi sıkı bir şekilde kontrol edilirken kronik böbrek yetmezlikli hastalarda bu kontrol mekanizması etkinliğini kaybeder. Karaciğerde hepatoma 3B ve Hep G2 hücrelerinde heme proteini ile oksijen düzeyi kontrol edilmektedir. Bilirubin düzeyi 2 mg üzerine çıktığında yapımın kontrolü bozulmaktadır (Spivak, 1998). Normal insanlarda ve son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda EPO yarı ömrü 4-12 saattir. Sıçanlarda ise EPO' nun yarı ömrü 1,5-2,5 saattir (Spivak ve Hogans, 1989). Lösemik hastalarda kan EPO düzeyi düşük seyrederken kemoterapi sonrası remisyonla beraber EPO düzeyinin artması, kemik hipoplazisi olan hastalarda EPO yarı ömrünün daha yüksek olması; yıkımının hematopoetik hücreler tarafından yapıldığını düşündürmektedir. Bununla beraber EPO yıkımının kemik iliği hücrelerinden bağımsız olarak karaciğer ve böbrekte gerçekleştiğine dair yayınların olması ise de günümüzde kabul edilen tüm yapıların olaya katıldığıdır. Hepatosellüler karsinoma, serebellar hemanjiblastoma gibi bazı tümöral hastalıklarda tümör hücrelerinden EPO salınımı nedeniyle kan EPO düzeyi yükselir ve eritrositoz gelişebilir. Kobalt, nikel, mangan, glukokortikoidler, tiroid hormonları, büyüme hormonu, vazopressin, testosteron, eikosanoidler ve desferoksamin gibi bazı endojen ve farmakolojik maddeler EPO salınımı ve yapımına neden olurken; karbonmonoksit, NO, nitroprussid, H₂O₂, TNF- α ve IL-1B gibi bazı inflamatuvar sitokinler, forbol esterleri, siklosamid gibi protein sentaz inhibitörleri EPO gen ekspresyonunu azaltmaktadır (Ebert ve Bunn, 1999).

1.1.7.3. Eritropoietin ve Böbreklerde Oksijen Algılayıcı Mekanizması:

EPO diğer hematopoetik faktörlerden farklıdır, çünkü EPO kemik iliğinde değil büyük oranda böbreklerde yapılır. Normal şartlarda eritrosit yapımı doku oksijen gereksinimi ile orantılıdır. EPO ilk yıllarda HIF-1 olarak adlandırılmıştır. Fakat daha sonra bu iki molekülün farklı oldukları anlaşılmıştır (Winearls, 1998). Böbrek ekstrasellüler sıvı hacmi ve oksijen basıncını kontrol eden bir ölçüm cihazı gibidir. EPO yapımıyla kırmızı hücre miktarı ve dolaşımdaki konsantrasyonları da düzenlenir. EPO, renin anjiyotensinojen sistemiyle etkileşerek tuz ve su atılımını

kontrol eder, plazma volümünü kontrol altında tutar ve hemotokrit % 45 civarında bir değerde sabitlenir. Bu hemotokrit değeri genel vücut dolaşımındaki oksijen miktarı için optimal bir değerdir. Böbreklerin ağırlığı, tüm vücut ağırlığının %1'i olduğu halde kalp debisinin % 20'sinden fazlasını alırlar. Ayrıca böbrekler kendilerine gelen oksijenin de sadece % 8-10'luk kısmını kullanırlar.

Böbrekte başlıca EPO yapım yeri, juktamedullar kortikal labirentlerin ucudur. Bu bölge kanlanması diğer böbrek bölgelerine göre daha az olan bir bölgedir ve tübüllerdeki metabolik olaylar aynı zamanda vücudun gereksinimlerini de yansıtması açısından önemlidir; örneğin Na^+/H^+ transport mekanizmalarının aktif çalışması oksijen tüketiminin artması demektir. Bunu EPO yapımı ve dokulara kan akımının artması takip eder. Proksimal tübülde her bir sodyum bir ATP kullanılarak geri emilirken henlenin çıkan kolunda üç ATP kullanılır. Proksimal tübüldeki oksijen konsantrasyonu aynı zamanda doku oksijenasyonunu da yansıtır (Fisher ve Nakashima, 1992, Donnely, 2003, Hir ve ark., 1991).

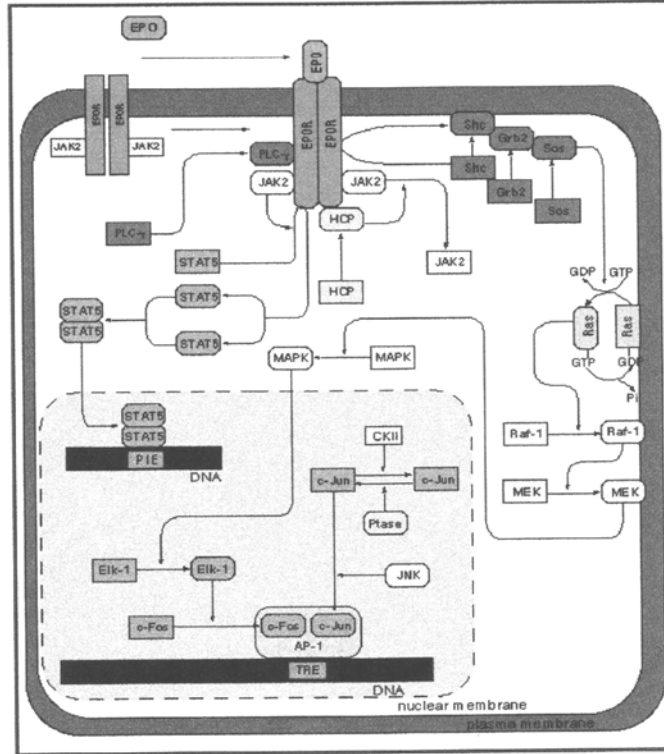
Dokuda oksijen konsantrasyonu azaldığında ise jukstaglomeruler hücreler uyarılarak anjiotensinojen II (ANG II) yapımı düzenlenir. ANG II'de doğrudan EPO yapımını uyarabilir (Nowicki ve ark., 1993), bu uyarıya cGMP, cAMP, intrasellüler kalsiyum artışının aracılık ettiği düşünülmektedir.

1.1.7.4. Eritropoietin Reseptörleri:

EPO reseptörleri (EPO R); prolaktin, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, makrofaj/granulosit koloni stimüle edici faktör, trombopoietin, büyüme hormonu ile aynı grupta yer alan homodimer yapıda tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörlerdir ve EPO (veya ephrin) reseptör ailesi olarak adlandırılırlar. EPO R fosforilasyonu takiben STAT5 ve JAK2' yi aktive ederek bir seri intrasellüler olayları başlatır. Shp1 gibi peptid yapıdaki bazı maddeler JAK2 kısmına bağlanarak EPO R aktivitesini inhibe ederler. Nöron büyüme faktörünün (NGF) de EPO R' nü aktive edebilme özelliği vardır. EPO; cGMP, IP_3 , intrasellüler Ca^{+2} gibi bazı hücre içi habercileri de

kullanmaktadır (Meredith ve Barbara, 1991, Lacombe ve Mayeux, 1999, Klingmüller, 1997).

EPO R uyarılması aktive olduğu hücre tipi ve çevre koşullarına göre sitokin aktivasyonu, apoptosis, mitojenik aktivite artışına neden olur.



Şekil 1.13: EPO R aktivasyonu ile başlayan sinyal iletim yolları: JAK aktivasyonu ile dimer oluşturan EPO R aktive olduktan sonra mitojenik aktivitesinde önemli rolü olan fosfolipaz C ve STAT yolu aktive olur. (<http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/pathway/epo.html>).

1.1.7.5. Eritropoietinin İskemi Reperfüzyon Hasarında Koruyucu Etkisi

Bilindiği üzere dokularda iskemiye ilk cevap EPO yapımının artışıdır. EPO'nun yaklaşık %90 ı böbreklerde peritübüler interstitial hücrelerde sentezlenmekte ve dolaşıma geçmektedir. İnsanda bazal serum EPO konsantrasyonu 15 ile 25 U/l.

arasındadır ve kişiden kişiyede farklılıklar gösterebilir. Ortamda O₂ konsantrasyonu azaldığında hücrelerden EPO sekresyonu başlamaktadır (Spivak ve Hogans, 1989, Ratlicffe ve ark., 1998).

EPO'nun hipoksiye cevap olarak salgılandığı 1970'lerden beri bilindiği halde sadece endokrin fonksiyon göstermediği ve hematopoietik etkilerinin yanısıra gerek sistemik gerekse lokal etkiyle hücrede koruyucu ve antiapoptotik etkilerinin de bulunduğu dair çalışmalar son 10 yılda artmaya başlamıştır (Juul, 2000). EPO'nun iskemik hasardan koruyucu olduğunu gösteren ilk çalışmalar daha çok kardiyak iskemi ve inme modelleridir. Myokardiyal iskemi çalışmalarının çoğunda EPO; iskemi başlamadan önce verilmiştir (Fliser ve ark., 2006). Yetişkinlerde kardiyak operasyonlardan önce veya çocuklarda konjenital kalp hastalıklarının tedavisine yönelik operasyonlardan önce EPO tedavisi uygulandığında mekanik fonksiyonların geri dönüşü ve enfarkt alanlarında iyileşme daha fazla olduğu gözlenmiştir. EPO'nun, anjioplasti veya trombolitik tedavi öncesinde, yani reperfüzyon öncesinde verildiğinde iskemiye bağlı apoptosisi azalttığı gösterilmiştir (Jones ve ark., 2005, Shaddy, 1995). Kardiyak iskemide EPO tedavisinin JAK/STAT yolunu aktive ederek protein kinaz aktivasyonu ile myokardiyal iskemiye toleransı arttırdığı gözlenmiştir (Rafiee ve ark., 2005). EPO'nun sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş kardiyak iskemik hasardaki koruyucu etkisinde K kanallarının aktivasyonu önemli bir rol oynarken NOS aktivasyonunun gerçekleşmediği gösterilmiştir (Joyeux-Faure, 2006). Nöronal iskemi modellerinde de EPO'nun anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, antioksidan etki göstererek iskemik, hidrojen peroksit, glutamat toksisitesine karşı koruyucu olduğu bulunmuştur (Sakanaka, 1998).

Deneysel ve klinik akut ve kronik iskemik veya toksik renal yetmezlik çalışmalarında 300-5000 IU/kg EPO'nun koruyucu olduğu görülmüştür. Bu etki nöronal etkilere benzerdir. EPO; renal I/R hasarında sitokin yapımını, lökosit adhezyonunu, migrasyonunu azaltarak anti-inflamatuvar etki göstermektedir (Ateş ve ark, 2005, Imamura ve ark., 2007, Sarples ve ark., 2004, Furuichi ve ark., 2002). EPO'nun cisplatin, siklosporin toksisitesinden koruyucu olduğu gösterilmiştir. EPO'nun akut koruyucu etkisi sırasında Hb konsantrasyonu değişmemektedir bu

nedenle bu etkinin dokuya spesifik doğrudan etki olduğu düşünülmektedir. Erken dönemde EPO tedavisi başlanan predializ hastalarının kronik yetmezliğe ilerlemesinin daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Bu hastalarda Hb konsantrasyonu EPO tedavisi almayan hastalara göre daha yüksek bulunmuştur (Sharples ve Yaqoob, 2006).

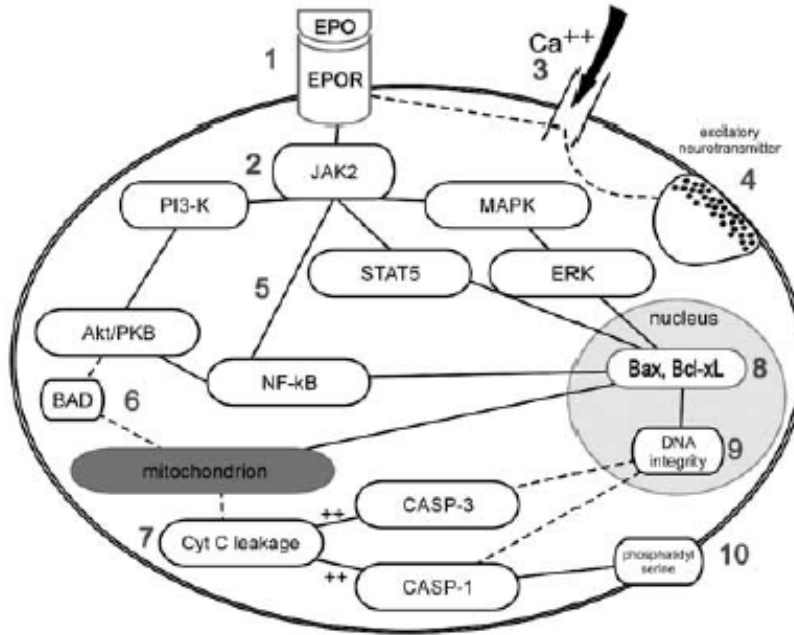
EPO yapısında yüksek oranda glikolize ve sialik asit yapısı bulundurur. Bu yapıda bulunan oligosakkaridler kolay parçalanabildiğinden serum EPO konsantrasyonu çok kısa sürede düşmektedir. EPO' nun alfa, beta, karbamile ve asialo gibi farklı rekombinant formları bulunmaktadır. AsialoEPO serum ömrü çok kısa olan fakat sitoprotektif etkisi çok yüksek olan formudur (Imamura ve ark., 2007). Bu nedenle çalışmalarda seçilen ve kullanılan EPO türü deney sonucunu ve koruyuculuk düzeyini etkileyebilmektedir.

EPO reseptörü yapı olarak tip I sitokin reseptörü formundadır. Fakat iskemik hasarlarda EPO tedavisi TNF- α , IL-6 düzeyini düşürerek anti-inflamatuvar etki gösterir (Liu ve ark., 2006).

EPO' nun doku koruyucu etkisinde 3 temel yolun aktif oluşu düşünülmektedir (şekil 1.14):

1. JAK2-STAT-Bcl yolu: Bu yol EPO'nun eritropoezi uyarmasını takiben aktive olan yoldur. Eritroid serisinde EPO, JAK/STAT yolu ile mitojenik aktiviteyi artırır, Bcl geninin aktivasyonunu artırır, Bax gen yapımını ise azaltır.
2. Akt /Protein Kinaz C yolu: EPO ile aktive olan diğer yaşamsal yol akt yoludur. Protein kinaz C ile de aktive olabilen bu yol, protein kinaz B, fosfoinositol 3 kinaz, Ras/mitojen aktive kinaz yollarını da kapsar.
3. NFkb yolu: JAK2 ile aktive olan bu yol dual etki gösterir.

Hipoksi sırasında dokularda akt, STAT2, ekstrasellüler sinyal ile ilişkili kinaz yapımında azalma olduğu, dokuda oluşan hasarında bu moleküllerdeki azalma ile korele olduğu bulunmuştur (Brines ve Cerami, 2006, Ghezzi ve Brines, 2004).

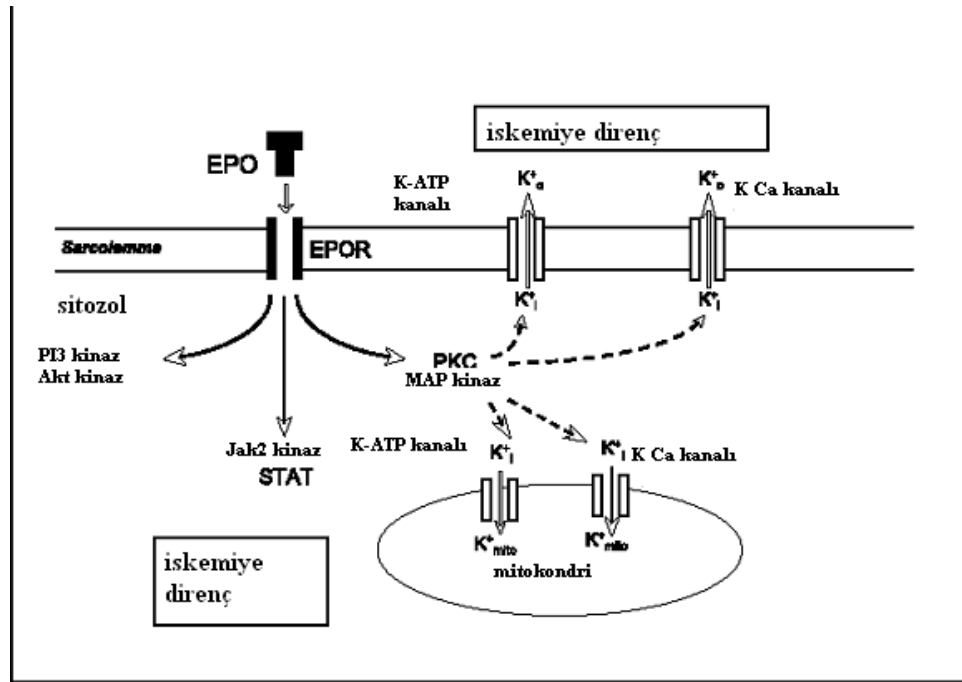


Şekil 1.14: EPO' nun antiapoptotik ve sitoprotektif etkisine katılan moleküller ve sinyal iletim yolları (Ghezzi ve Brines, 2004).

1.1.7.6. Eritropoietin ve K-ATP Kanalları

Tavşan kalbiyle yapılan çalışmalarda EPO ile oluşan önşartlanmada K-ATP kanallarının açılmasının yer aldığı görülmüştür. Sarkolemmal K-ATP kanal blokörü HMR 1098 ile ve mitokondriyal K-ATP kanal blokörü 5-hydroxydecanoate ile yapılan çalışmada bu kanal blokörlerinin EPO' nun koruyucu etkisini bloke ettikleri gösterilmiştir. PK C aktivasyonunun hem sarkolemmal hem de mitokondriyal K kanallarının açılmasını sağladığı bilinmektedir. EPO' nun güçlü bir PK C aktivatörü olduğu düşünüldüğünde EPO etkilerinde doğrudan K kanallarının değil de PK C aktivasyonunun rol aldığı düşünülmüştür. PK C açılımı aynı zamanda MAPK kinaz aktivasyonunu da sağlamaktadır (Joyeux-Faure ve ark., 2006).

K-ATP kanalları dışında iç mitokondriyal membranda ve sarkolemmal membranda kalsiyum ile aktive olan bir potasyum kanalı daha mevcuttur. Kardiyak iskemik hasarda bu kanalların açılmasının da kalbe koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir. Kalsiyum ile aktive olan K kanal blokörü paxilline ile yapılan çalışmalarda da EPO'ya bağlı önşartlanma etkisinin azaldığı gözlenmiştir (Joyeux-Faure ve ark., 2006, Baker, 2005) (Şekil 1.15).

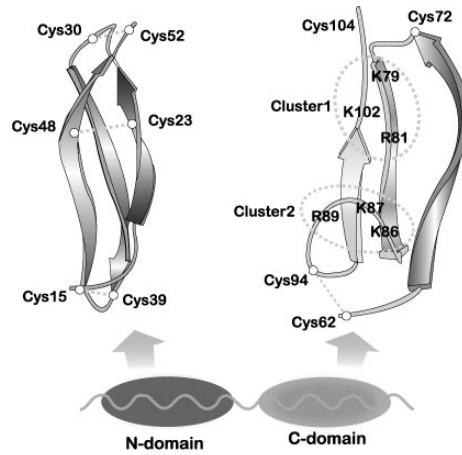


Şekil 1.15: EPO ve K-ATP kanalları: Hücrede EPO ile aktive olan K kanalları: EPO R aktivasyonunu takiben aktive olan ileti yollarının hücre membranındaki ve mitokondriyal K kanallarıyla etkileşimi ve iskemik hasara direnç gelişimi görülmektedir (Joyeux-Faure ve ark., 2006).

1.1.8. Midkin ve Iskemi Reperfüzyon Hasarı

Midkin ailesi, heparine bağlanan büyüme faktörü midkin ve pleiotrophinden oluşmaktadır. Pleiotrophin; heparin bağlayan büyüme ilişkili molekül (HB-GAM), osteoblast stimüle edici faktör (OSF-1), heparin bağlayıcı nöronal faktör (HBNF) olarak da adlandırılmaktadır. Midkin ve pleiotrophin arasında %45 yapısal benzerlik vardır. Midkin ve pleiotrophin nöronal gelişimden mitojenik aktiviteye kadar pek çok yola katılmaktadır (Mitsiadis ve ark., 1995, Muramatsu, 2002).

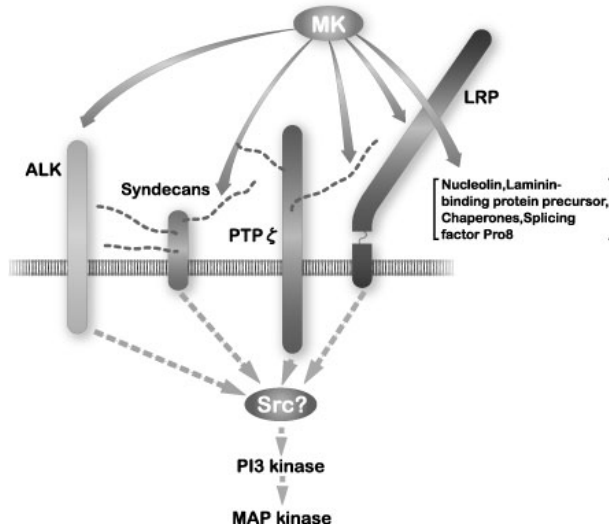
Midkin; 13 kDa ağırlığında, çoğunlukla bazik proteinlerden oluşan bir moleküldür ve retinoik asite cevap veren bir genin ürünüdür. Midkin; heparine bağlanan büyüme ve farklılaşma faktörü olarak bilinmektedir. Midkin disulfid bağlarıyla birbirine bağlanmış 2 parçadan oluşur, her bir parça birbirine paralel olmayan 3 şeritten oluşmaktadır (Muramatsu, 2002) (Şekil 1.16).



Şekil-1.16: Midkinin yapısı: C parçasındaki heparin bağlanan 2 kısım işaretlemiştir. (Muramatsu, 2002).

Midkin; hücre yüzeyinde pek çok reseptörün aktive olmasına neden olur. protein tirozin fosfataz z (PTP z), düşük moleküler ağırlıklı lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP), anaplastik lösemi kinaz (ALK) ve transmembran heparan

sulfat proteoglikan ailesinden syndecanların midkin sinyal sisteminde yer aldığı bulunmuştur (Muramatsu, 2002, Owada ve ark., 1999). (Şekil 1.17)



Şekil 1.17: Midkinin Reseptör Tipi (Muramatsu, 2002).

Midkin; fare embryogenezinin midgestasyonel döneminde, özellikle epitelial-mezenkimal ilişkilerin olduğu bölgelerde, nöronal dokunun farklılaşması sırasında, mezenkimal dokuların yeniden yapılanması sırasında yoğun olarak sentezlenmektedir (Midsiadis ve ark., 1995). Bu embryolojik gelişimin en tipik örneklerinden biri de akciğer gelişimidir. Kan damarlarının endotelial hücreleri, bazı organların muköz epiteli midkin ekspresyonunun yoğun yapıldığı kısımlardır. Dokuda hasarlanma oluştuğunda lokal midkin yapımı veya mevcut ekspresyonu artar (Kaplan ve ark., 2003, Matsuura ve ark., 2002).

Midkin ekspresyonu öncelikle embriyonal kökenli karsinomlar olmak üzere pek çok tümoral oluşumda artmaktadır. Özafagus, mide, kolon, hepatosellüler, akciğer, meme, tiroid, prostat, mesane, koloanjiokarsinom nöroblastom, glioblastom, Hodgkin hastalığı ve Wilms tümöründe midkin yapımının çok arttığı görülmüştür (Muramatsu, 2002).

Midkinin; farklı hücreler üzerinde

1. Anjiojenetik (Choudhuri ve ark., 1997)
2. Fibrinolitik (Horiba, 2000)
3. Mitojenik (Muramatsu, 2002)
4. Anti-apoptotik (Michikawa, 1999)
5. Transforme edici (Kurtz ve ark., 1995)
6. Kemotaktik özelliklerinin (Sato ve ark., 2002) olduğu gösterilmiştir.

Midkinin; nötrofil ve makrofajların migrasyonunu arttırdığı, immün hücrelerden sitokin yapımını arttırdığına dair az sayıda yayın bulunmaktadır. Midkin knockout farelerde renal iskemik hasarın daha az olduğu gösterilmiştir. Normalde böbrekte midkin ekspresyonu karaciğere göre daha azdır. I/R hasarından sonra midkin ekspresyonunun özellikle proksimal tübüllerde ve yakın alanda arttığı gözlenmiştir. Midkin olmamasının I/R hasarındaki inflamasyonu azalttığı ve gene midkin knockout farelerde MIP-2 ve MCP-1 düzeylerinin daha az olduğu bulunmuştur (Sada ve ark., 2001, Lien ve ark., 2003). Her ne kadar bu yayınlara baktığımızda midkin I/R hasarını arttırıcı bir sitokin rolünde görülse de Wada ve ark. (2002), postmortem insan iskemik beyin otopsilerinde midkin ekspresyonunun arttığını görmüşler, fakat ilginç olan midkin ekspresyonunun fazla olduğu bölgelerde dokuların daha iyi korunduğunu gözlemlemişlerdir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler:

2.1.1. Deney Hayvanları:

Deneylede Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji Araştırma ve Geliştirme Birimi, hayvan laboratuvarında üretilen yetişkin erkek 250-300 g. ağırlığında Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar standart koşullarda, standart sıçan sanayi yemleri ve çeşme suyu ile ad libitum beslenmiştir. Tüm çalışmalar Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu' nun izni alındıktan sonra saat 10.00-15.00 arasında gün ışığında Moleküler Biyoloji Araştırma ve Geliştirme Birimi in vivo araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

2. 1. 2. Kullanılan Madde ve Aletler

2. 1. 2. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Heparin (sigma) – 100 IU/ml olacak şekilde SF içinde sulandırıldı.

Ketamin HCl (Parke-Davis, 50 mg/ml)

Rompun %2 (Bayer)

% 10 NaOH (Sigma)

Sulfanamid (Merck)

NEDD (Merck)

H₃PO₄ (Merck)

Sodyum nitrit (Sigma)

Nitrit/nitratsız distile su

Nötral fosfat tamponatı

EPO (rHuEPO: Rekombinant insan EPO'ü; Eporex, Santa Farma 4000 IU/2 ml solüsyon)

Glibenklamid (Sigma)

CaCl₂ (Applichem)

Tris/Cl (Applichem)

Propil alkol (Applichem)

Etil alkol (Applichem)

NaCl (Merck)

Na₂HPO₄ (Merck)

NaH₂PO₄ (Merck)

Taq DNA Polimerase (Metis)

10X PCR Buffer (Fermentas)

10 mM dNTP set (Fermentas)

25mM MgCl₂ (Fermentas)

Agarose (Applichem)

Ethidium Bromide (AMRESCO)

Primerler (Metis)

DNA moleküler büyüklük belirteci (DNA Micromarker Code E84, AMRESCO,)

Rat TNF ELISA geliştirme kiti (R&D)

Streptavidin-HRP (Sigma)

Substrat solusyonu (1:1 oranında H₂O₂+ Tetrametilbenzidin) (KPL)

Stop solusyonu(2N H₂SO₄) (KPL)

Rat IL-6 ELISA geliştirme kiti (R&D)

Anti-human midkin (Peptotech)

Rekombinant insan midkin (Peptotech)

Biotinylated anti-human midkin (Peptotech)

Tween 20 (Sigma)

Saf su

BCA (bicinchoninic acid) Protein ölçüm kit (Pierce)

2. 1. 2. 2. Kullanılan Gereçler:

2. 1. 2. 2.1. Cerrahi Malzemeler

Genel amaçlı cerrahi makas

Damar makasları

Eğri doku forsepsi

Eğri iris forsepsi

Sivri uçlu forsepsler

Nontravmatik buldog klemp

Hemostatik forsepler

2.1.2.2.2. Diğer Gereçler

Sıçan rektal problu, infraruj ısıtma sistemi; Commat

Manyetik karıştırıcı-Torrey Plus Scientific

Shaker PSU-2T plus; Biosan

Spectromax M2-Molecular Devices-spektrometre-florimetre

Kodak Image Station 4000 MM- invivo invitro görüntüleme cihazı

PCR gene amplifier 9700 Applied Biosystems- PCR

Heto Ultrafreeze -80°C

Milli RO plus 60 su arıtma sistemi

Nanopure infinity- su arıtma sistemi

ELISA washer Biotek- ELISA plak yıkayıcısı

Corning pHmeter-pH metre

Kuyruktan kan basıncı ölçüm cihazı; BIOPAC,

Vorteks-Stuart Scientific

Mikrosantrifüj (Elektro-Mag)

İnfüzyon pompası (Commat)

Polietilen PE 100 tip kanül
Polietilen PE 50 tip kanül
Polietilen 2 ml lik pastör pipetleri
Mikrosantrifüj 0,5-1,5 ml lik kapaklı tüpler
RNA-DNA free 0.2, 0.5, 1.5 ml lik kapaklı sentrifuj tüpleri
Steril ve nonsteril 10, 100, 1000 µl lik pipet uçları
Polietilen ip 5/0
Cam tüpler (5 ml)
Otomatik mikropipetler (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)
96 ve 384 kuyucuklu ELISA plakları (Greiner)
Homojenizatör (Ultra thorax)
Hamilton şırıngası 100 µl lik

2.2. Cerrahi İşlem ve Deney Protokolü

2.2.1. Anestezi ve Operasyona Hazırlık:

Deneye alınan sıçanların anestezisi intraperitoneal (i.p.) olarak verilen 50 mg/ml/kg Ketamin ve 10 mg/kg Rompun ile yapılmıştır. Anestezi derinliği injeksiyon sonrası 5 dk beklenerek göz refleksi ve “ağrılı stimulusa yanıt” (forsepsle sıçan ayağının sıkıştırılması) ile belirlenmiştir.

Anestezi edilen hayvanlar operasyon masasına alınıp ekstremitelerinden birer flaster ile tespit edilip, dezenfektan madde (Betadin) ile işlem alanları temizlenmiştir. Kan alımı için için sol femoral ven kateterizasyonu (PE50 tip); zamanlı idrar toplamları için idrar kesesi (PE100) kateterize edilmiştir. Deney boyunca deney hayvanının vücut sıcaklığı rektal probe aracılığıyla kontrol edilerek, ısıtmalı operasyon masası ile $37 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ de tutulmuştur.

2.2. 2. Femoral Ven Kateterizasyonu:

Sol inguinal alanda küçük bir insizyon yapılarak küt disseksiyonla genişletilmiş ve deriyi ekstremitte kaslarına yapıştıran bağ dokusu karın duvarına doğru forsepsin iki ucu açılarak ameliyat alanı tamamen ortaya çıkarılmıştır. Arter ve ven üzerindeki zar ince pensler yardımı ile uzaklaştırılıp, ikisi birbirinden izole edilmiştir. Uygun uzunlukta izole edilen ven etraflarından bir vücut bir de ekstremitte tarafından olmak üzere ikişer 5/0 tip ip geçirilmiştir. Ven damarı hafifce gerilecek şekilde iki ip arasında forseps yardımı ile askıya alınmıştır. Bu şekilde vücut tarafındaki ip ile hemostatik etki uygulanmış ve damar üzerindeki işlem kolaylaştırılmıştır. Damar üzerine yarısından fazla olmayacak şekilde küçük, eğik (45°) bir kesit yapılarak, çok ince bir forsepsle açık tutulabilecek bir çentik oluşturulup içi heparinli SF (100 IU/ml) ile doldurulmuş PE-50 tip polietilen kanül 2-3 cm damar içine itilerek yerleştirilmiştir. Kanül ip ile bağlanarak tespit edilmiştir. Kanın pıhtılaşmasını önlemek için kanülün serbest ucundan heparinli SF ile dolu injektör yardımı ile 0,2 cc verilerek sıçan heparinlenmiştir.

2.2. 3. İdrar Kesesi Kateterizasyonu:

Zamanlı idrar toplanması için idrar kesesi kateterizasyonu yapılmıştır. Bunun için pubis bölgesinde orta hatta 0,5 mm lik insizyon yapıp, küt disseksiyon ile periton içine girilip idrar kesesine ulaşılmıştır. Periton içinden kıvrık uçlu pens yardımı ile idrar kesesi dışarı alınarak kavernöz damarların az olduğu apeks bölgesinden küçük bir kesi yapılmıştır. İdrar kesesine polietilen IE 100 tip kanül yerleştirilip tespit edilmiştir. Pens yardımı ile idrar kesesi tekrar periton içine alınmıştır. Sıçana sol yan pozisyonu verilerek idrarın graviteye bağlı serbest akışı sağlanmıştır. İdrar kanül ucunda yerleştirilen darası alınmış santrifüj tüpleri içine toplanmıştır.

Sıçan vücut sıcaklığı (37 ± 0.5 °C) sabit tutulmak için, sıçana uygun ısı kontrollü operasyon masası kullanılmıştır. Sıvı kaybını azaltmak için kanülasyon bölgelerine SF ile ıslatılmış gazlı bez kullanılmıştır.

2.2. 4. Renal Arter ve Ven Iskemisi:

Periton orta hattan insize edilerek barsaklar yana alınmış böbrek damarları açığa çıkarılmıştır. Her iki böbrek arter ve venleri deney prosedürüne uygun olarak nontravmatik vasküler bulldog klempler yardımıyla oklüze edilmiştir. Cerrahi işlemlerden sonra sıçan 15 dk lık stabilizasyon perioduna bırakılmıştır. İşlem sırasında abdominal kanama olmamasına dikkat edilmiş; cerrahi sırasında sorun yaşanan hayvanlar deneyden çıkarılmıştır.

2.3. 5. Deney Protokolü:

Çalışma kapsamında sıçanlarda deneysel iki taraflı renal IR modeli oluşturulmuştur. EPO' nun I/R hasarındaki etkisi belirlenmiş ve bu etkinin K-ATP kanal inhibitörü glibenklamid ile inhibe edilip edilemediği araştırılmıştır. Çalışma; 200-250 gr ağırlığında her iki cinse ait 100 adet Spraque-Dawley türü sıçan ile 10 grupta (n=10/grup) gerçekleştirilmiştir.

- Grup I: Sham opere, saline enjekte ip, (sham)
- Grup II: Sham opere+ 500 IU/kg EPO, (shamepo)
- Grup III: Sham opere+glibenklamid (40 mM/kg), (shamgli)
- Grup IV: Sham opere+EPO+glibenklamid, (shamepogli)
- Grup V: Kontrol. I/R yapılmış salin enjekte, (IR)
- Grup VI: I/R +500 IU/kg EPO, (IRepo)
- Grup VII: I/R+önşartlanma, (pre)
- Grup VIII: I/R+ glibenklamid, (IRgli)
- Grup IX: IR+EPO+glibenklamid, (IRepogli)
- Grup X: IR+önşartlanma+glibenklamid (pregli)

Deneyde EPO; daha önceki yayınlarda renal I/R hasarı tedavisinde kullanılan ve etkinliği gösterilmiş olan 500 IU/kg dozdan verilmiştir. Glibenklamid dozu da önceki yayınlarda renal I/R hasarında koruyucu olduğu gösterilmiş olan dozdan (40 mM/kg) verilmiştir. Bu doz aynı zamanda mitokondriyal K-ATP kanal inhibisyonunda kullanılan dozla aynı miktardadır. Glibenklamid toz şeklinde bulunmaktadır. Serum fizyolojik içinde tam olarak çözünmemektedir, maddenin DMSO veya metanol içinde tam çözünmesi mümkündür. Fakat bu maddelerin deney seyrini etkileyebileceği düşünülerek glibenklamid serum fizyolojik içinde sulandırılarak hazırlanan solusyon i.p. olarak enjekte edilmiştir. Tüm deney gruplarına eş zamanlı olarak ve glibenklamidin sulandırıldığı miktarda serum fizyolojik i.p. olarak verilmiştir.

Sıçanlar 50 mg/kg ip ketamin ve rompun ile anestezi edildikten sonra aseptik koşullarda femoral ven kateterizasyonu (PE50 kanül ile) ve takiben orta hat abdominal insizyonu yapılarak mesaneye PE100 kanül yerleştirilmiştir. Deney boyunca vücut sıcaklığı rektal proba kontrollü ısıtılmalı deney masasında 37 ± 0.5 °C de sabit tutulmuştur. Stabilizasyon periyodunu (15 dk) takiben protokole göre her iki renal arter non travmatik vasküler klemple 45 dakika oklüze edilmiştir. Klempler çıkarılarak böbreklere kan akımının yeniden gelmesi sağlanmıştır. Dört saatlik reperfüzyondan sonra her iki böbrek histopatolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler için çıkarılmıştır.

İlaçlar grup protokollerine uygun olarak iskemiden 30 dk önce verilmiştir. Önşartlanma 45 dk lık iskemiden 30 dk önce 5 dk iskemi ve takiben reperfüzyon yapılarak oluşturulmuştur. İlaçlar protokollerine uygun şekilde 5 dk iskemiyle eşzamanlı olarak verilmektedir.

Deney boyunca mesane ve femoral ven kateterizasyonu yapılarak dakikalık idrar akım hızı ve kreatin klerensi ile glomerüler filtrasyon değerlendirilmek üzere kan ve idrar örnekleri toplanmıştır. Femoral vendeki kateter deney boyunca kan alımında kullanılmıştır. Stabilizasyon periyodunu takiben kan glukoz düzeyini

belirlemek amacıyla 0.2 ml'yi geçmeyen kan örneği alınmıştır. Deney sonu glukoz ölçümü ise deney sonlandırılırken alınan kan örneği kullanılarak ölçülmüştür. Kan örnekleri 3000 devirde 4 °C de 10 dk santrifuj edildikten sonra serumları alınarak daha sonra ölçüm yapmak üzere temiz santrifuj tüplerine konulmuştur. Deney boyunca toplanan idrar ve serum numuneleri mikrosantrifüj tüplerde –80 °C lik derin dondurucuda analiz zamanına kadar saklanmıştır.

Kan basıncı ve kalp hızı değerleri; reperfüzyon döneminde kuyruktan ölçülerek elde edilmiştir.

Deney bitiminde çıkarılan ve homojenize edilen dokular ve kan örnekleri sentrifüj edilmiş; süpernatantları alınarak yapılacak ölçüm yöntemine uygun olarak –80⁰C'de dondurucuda değerlendirmeler yapılana kadar saklanmıştır.

2. 3. 6. Tez Kapsamında Değerlendirilen Parametreler:

- a. Histopatolojik değerlendirme: Kortikal ve medullar bölgede glomerüller ve tübüler yapıların ışık mikroskopisiyle değerlendirmesi
- b. Apoptosis değerlendirmesi için böbrek dokusunda kaspaz-3 düzeyi
- c. Renal fonksiyonların değerlendirilmesi: GFR ve tübüler fonksiyon açısından serum ve idrardan Na ve K düzeyi ölçümü yapılarak Fraksiyone Na, K çıkışı değerlendirmesi, dakikalık idrar akım hızı, kreatinin klerensi tayini
- d. Kan glukoz düzeyi başlangıç ve deney sonu
- e. Deney boyunca kuyruktan kan basıncı kontrolü
- f. Böbrek dokusunda HIF-1 alfa mRNA ekspresyonu
- g. Böbrek dokusu TNF-alfa, IL-6 , nitrit düzeyleri
- h. Böbrek dokusunda midkin düzeyleri

2. 4. Analiz Yöntemleri:

2. 4. 1. Histopatolojik İnceleme:

% 10 formaldehit içinde fikse edilen dokular 5 µm eninde kesitler alındıktan sonra parafine gömülmüş ve H&E ile boyanmıştır. Kesitler Zeiss axioskop fotomikroskopisi ile fotograflanmıştır. Doku örneklerinin değerlendirilmesinde Chatterjee ve ark. nın (2000; Kidney Int.) Mc Winnie ve ark. modifiye methodu kullanılarak böbrek hasarı skorlanmıştır. Rastgele alanlar seçilerek kortikal bölge X20 büyütmede 25 alana bakılmış ve her bir alana düşen tübüler yapı değerlendirilmiştir. Sonuçta her bir böbrek total 100 (en kötü) olarak skorlanmıştır.

Değerlendirme yapılırken 4 skora kullanılmıştır:1,2,3,4.

Skor 1: Normal histoloji

Skor 2: Tübüler hücre şişmesi, fırçamsı kenar kaybı, nükleer yoğunlaşma, tübüllerin üst 1/3 ünde nükleer kayıp

Skor 3: Skor 1 ile aynı parametreler fakat bulgular tübüllerin üst 2/3 ünde

Skor 4: Tübüllerin üst 2/3 ünden fazlasında hasarlanma ve nükleer kayıp olması durumu.

2. 4. 2. Apoptosis Değerlendirilmesi:

Böbrek dokusunda apoptosis değerlendirilmesi için kaspaz-3 düzeyi kolorometrik olarak ölçülmüştür. Doku protein düzeyi Bradford yöntemi ile ölçülerek; 100 µg protein içeren doku örneği, kaspaz-3 düzeyi için değerlendirilmiştir. 100 µg protein, assay tamponu ile dilue edilmiştir (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, % 0.1 CHAPS, 10 mM DTT, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, %0.1 Triton X-100). Kolorometrik substratlarla (Ac-DEVD-pNA, Ac-YVAD-

*p*NA, IETD-*p*NA, or LEHD-*p*NA.) 25° C’de inkübe edilmiştir. Final konsantrasyonu *p*NA boyası’nın 405 nm de absorbansının değerlendirilmesiyle belirlenmiştir. Sonuçlar bilinen *p*-NA (*p*Nitroanilin) konsantrasyonuna karşılık pM substrat/ dk/ µg protein olarak verilmiştir.

2. 4. 3. Doku Sitokin ve Midkin Düzeyi Ölçümü:

Böbrek doku örneklerinden elde edilen protein ekstratları proteaz inhibitörü içeren (aprotinin, leupeptine, pepstatine, PMSF- her birinden 2 mg/ml) birj 150 lizis solüsyonu (tris 1 M, EDTA 0.5 M, NaCl 5M, % 10 brij 96, % 10 NP40 suda) içinde dokular buz içerisinde homojenize edilerek elde edilmiştir. Homojenizasyon sırasında doku ağırlıkları tartılarak lizis solüsyonundan örnek ağırlığının 2 katı olacak şekilde eklenmiştir (Powergen homojenizatör 125, Fisher Scientific). Ölçümler yapıncaya kadar homojenatlar –80 ° C de dondurucuda saklanmıştır.

Doku ve serum örnekleri, kit prosedürlerine uygun olarak TNF-α değerlendirilmek üzere ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. Yönteme göre TNF capture antikoru (100ug/ml) 1ug/ml olacak şekilde 1 ml PBS içinde hazırlanarak her bir kuyucuğa 100 µL konmuştur. 16 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Takiben PBS-Tween ile plak 2 defa yıkanıp her kuyucuğa 200 µL bloklama solüsyonu (%1 BSA; PBS içinde) konarak yarım saat 37 C °de yarım saatte oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bloklamayı takiben örnekler ve TNF-α standartları 100 µL kuyucuklara konulmuştur. Standart 4ng/ml’den başlanıp ½ %1 BSA PBS içinde dilüe dilmiştir. Bu şekilde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklar PBS-Tween ile 4 defa yıkanarak TNF detection antikoru (0.25 ug/ml %1 BSA içinde) 100 µL konulmuştur. Tekrar plak PBS-Tween ile 4 defa yıkanıp Streptavidin-HRP 1/200 sulandırılarak her welle 100 µL konmuş ve yarım saat inkübe edilmiştir. Takiben PBS-Tween ile plak 4 defa yıkanıp her kuyucuğa 100 µL substrat solüsyonundan konularak renklenme oluşuncaya kadar yaklaşık 15 dakika beklenmiştir. Daha sonra her kuyucuğa 50 ul stop solüsyonu konup 450 nm’de ELISA okuyucuda okutulmuştur.

IL-6 ve midkin düzeyleri de aynı konsantrasyonlardan başlanarak ve aynı protokolle sadece uygun antikolar kullanılarak ölçülmüştür.

2. 4. 4. BCA (bicinchoninic acid) Protein Ölçüm Kiti ile Protein Miktar Tayini

BSA standartı hazırlanması: 2 mg/ml BSA ana stoğu hazırlanır.

A----- 0 hacimde dilüent (%0.9 NaCl) + 300 ul stok
 B-----125ul hacimde dilüent (%0.9 NaCl) + 375 ul stok
 C-----325ul hacimde dilüent (%0.9 NaCl) + 325 ul stok
 D-----175ul hacimde dilüent (%0.9 NaCl) + 175 ul B epedorfundaki solüsyondan
 E-----325ul hacimde dilüent (%0.9 NaCl) + 325 ul C epedorfundaki solüsyondan
 F-----325ul hacimde dilüent (%0.9 NaCl) + 325 ul E epedorfundaki solüsyondan
 G-----325ul hacimde dilüent (%0.9 NaCl) + 325 ul F epedorfundaki solüsyondan
 H----1400ul hacimde dilüent (%0.9 NaCl) + 0

Final BSA konsantrasyonları A (2000ug/ml), B (1500ug/ml), C (1000ug/ml), D (750ug/ml), E (500ug/ml), F (250ug/ml), G (125ug/ml), H (0ug/ml) olacak şekilde standartlar hazırlanmıştır.

ELISA plağına her standarttan ve örneklerden 25 µl konularak üzerine 200 µl WR (çalışma reaktanı= 50A solüsyonu:1 B solüsyonu) eklenerek 3 saniye kadar çalkalayıcı da plaka çalkalanmıştır. Daha sonra 30 dakika 37 °C'de inkübe edilip 562 nm'de ELISA okuyucu da okutulmuştur.

2. 4. 5. Nitrit Ölçümü

Biyolojik sistemlerde NO nun in vivo olarak direkt ölçümü, düşük miktarlarda oluşması ve oluşuktan sonra hızla oksijen ile etkileşerek reaksiyona girmesi nedeniyle oldukça zordur. Bu nedenle, NO indikatörü olarak onun stabl ürünleri olan nitrit ve nitrat ölçümü sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada Diazotizasyon yöntemiyle nitrit miktarı NO miktarını ölçmek amacıyla kullanılmıştır. Diazotizasyon yöntemi, nitritin asidik ortamda primer bir aromatik aminle (sülfanamid) diazotizasyonu ve N-(1-naftil) etidiamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanır (Griess Reaksiyonu). Sonuçta oluşan bileşik 545-555 nm dalga boyundaki ışığı absorblayabilen mor bir azo boyasıdır (Tunctan ve Abacıoğlu, 1998).

Sülfanamid: H_3PO_4 'ün % 85 lik çözeltisinden % 2.5 lik çözeltisi suda hazırlanır. % 2.5 lik H_3PO_4 içinde % 1 lik sülfanamid hazırlanır. NEDD: % 2.5 lik H_3PO_4 içinde %0.1 lik NEDD çözeltisi hazırlanır. Standart için sodyum nitritin saf suda 0.25-50 μM aralığında dilüsyonları hazırlanır. Bu yöntemde ölçümü yapılacak olan örnekten 100 μL alınır, ölçümde kullanılacak olan kuyucuklu kültür plaklarına yerleştirilir. Örnek üzerine 50 μL sülfanamid çözeltisi ve 50 μL NEDD çözeltisi eklenir. Oda sıcaklığında 15 dk bekleyen kültür plakları spektrofotometreye yerleştirilir ve örneklerin verdiği absorbanslar 620 nm referans değere karşı 550 nm de okunur. Çeşitli dilüsyonlarda sodyum nitrit hazırlanarak absorbans değerleri okunur ve standart değerleri ile kalibrasyon denklemleri elde edilir. Örneklerde okunan absorbans değerlerinden , bu kalibrasyon denklemler kullanılarak örneklerdeki nitrit miktarları hesaplanır.

2. 4. 6. Doku mRNA Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi:

Referans protokollerine uygun olarak böbrek dokusundan total RNA; guanidinium thiocyanate fenol kloroform ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. Örneklerdeki RNA miktarı UV spektrometre ile OD260 de ölçülerek; RNA ların

degradasyonu ve bütünlüğü agaroz (%1,5 TAE) jelde değerlendirilmiştir. DNA kontaminasyonunu engellemek için örnekler DNA ase ile muamele edilmiştir. Konsantrasyon hesabı yapılarak, her bir örnekten 1µgr RNA kullanılarak cDNA sentez kiti ile 20 µL cDNA ya çevrilmiştir. cDNA örnekleri daha sonraki HIF-1 α mRNA düzeyinin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere derin dondurucuda -80 °C de saklanmıştır.

PCR protokollerinde her bir değerlendirme için 1 µL cDNA, 1µL reverse primer, 1 µL forward primer, 0.5 µL tag polimeraz, 5 µL MgCl₂, 5 µL PCR tamponu kullanılmıştır. İnternal kontrol olarak β-aktin geninin mRNA'sı kullanılmıştır. Elde edilen cDNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütülüp dansitometrik analizi yapılmış ve kontrol grupları ile karşılaştırılarak ekspresyon ifadelerindeki değişim gösterilmiştir.

mRNA ekspresyonlarında kullanılan primer dizileri:

HIF-1 α forward 5'-TGC TTG GTG CTG ATT TGT GA-3'

HIF-1 α reverse 5'-GGT CAG ATG ATC AGA GTC CA-3'

β-Actin

Forward, 5'-GTAGCCATCCAGGCTGTGTT-3'

Reverse 5'-CCCTCATAGATGGGCACAGT-3'

PCR protokol: 94 °C de 30 saniye, 60 °C 1 dk, 70 °C 2 dk şeklinde 34 siklüste değerlendirilmiştir (Powell ve ark., 2002).

2. 4. 7. Üre, Kreatinin, Glukoz, Na, K Ölçümü

2. 4. 7.1. Glomeruler Filtrasyon Hızı, Fraksiyone Na ve K Atılımı Hesaplanması

Deney sonlandırıldığında hem sitokin analizleri için hem de deney süresince glomerüler ve tübüler fonksiyonları değerlendirebilmek için kan örneği alınmıştır. Deney süresinde mesaneye yerleştirilen kateter yardımıyla idrar örnekleri

toplanmıştır. Total idrar volümü katederden takip edilmiş ve glukoz, kreatinin, Na, K, üre düzeyleri idrar ve serum örneklerinde otoanalizör (Roche 900 otoanalizör) ile uygun kitler kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen değerler kreatinin klerensi, fraksiyone Na ve K atılımı hesaplanmasında kullanılmıştır.

Kreatinin Klirensi = (İdrar Konsantrasyonu X İdrar volümü / (Plazma Konsantrasyonu X zaman)

FeNa (%) = (İdrar Na X plazma kreatinin) / (İdrar kreatinin X Plazma Na) X 100

FeK (%) = (İdrar K X plazma kreatinin) / (İdrar kreatinin X Plazma K) X 100

2.5. İstatistiksel Analiz:

Parametrik sonuçların analizi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre gerekli görüldüğünde uygun istatistiksel işlemler de eklenmiştir. Grup ortalamaları farklı bulunan sonuçlara Tukey testi uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama± SEM olarak verilmiştir. P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Çalışma kapsamında sıçanlarda deneysel iki taraflı renal IR modeli oluşturulmuştur. EPO' nun IR hasarındaki etkisi belirlenmiş ve bu etkinin K-ATP kanal inhibitörü glibenklamid ile inhibe edilip edilemediği araştırılmıştır. Çalışma; 200-250 gr ağırlığında her iki cinse ait 100 adet Spraque-Dawley türü sıçan ile 10 grupta (n=10/grup) gerçekleştirilmiştir.

Grup I: Sham opere, saline enjekte ip,

- Grup II: Sham opere+ 500 IU/kg EPO ip,
 Grup III: Sham opere+glibenklamid (K-ATP kanal blokörü-40 mM/kg),
 Grup IV: Sham opere+EPO+glibenklamid ip,
 Grup V: Kontrol. I/R yapılmış salin enjekte,
 Grup VI: I/R +500 IU/kg EPO ip,
 Grup VII: I/R+önşartlanma,
 Grup VIII: I/R+ glibenklamid,
 Grup IX: IR+EPO+glibenklamid,
 Grup X: I/R+önşartlanma+glibenklamid.

3.1. Histopatolojik Değerlendirme:

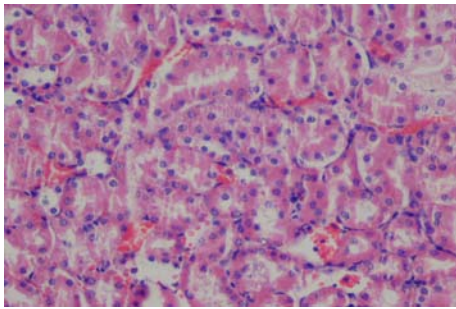
Böbrek dokularındaki hasarlanma değerlendirilirken rastgele alanlar seçilerek kortikal bölge X20 büyütmede 25 alana bakılmış ve her bir alana düşen tübüler yapı değerlendirilmiştir. Örneklerde 4 skora kullanılmıştır: 1,2,3,4 (Şekil 3.1).

Skor 1: Normal histoloji

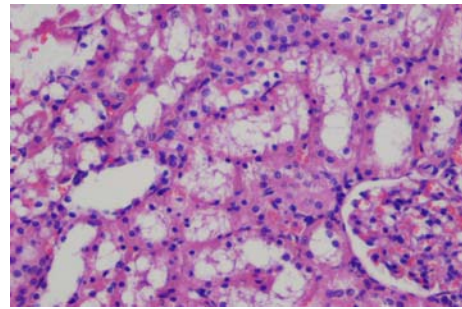
Skor 2: Tübüler hücre şişmesi, fırçamsı kenar kaybı, nükleer yoğunlaşma, tübüllerin üst 1/3 ünde nükleer kayıp

Skor 3: Skor 1 ile aynı parametreler fakat bulgular tübüllerin üst 2/3 ünde

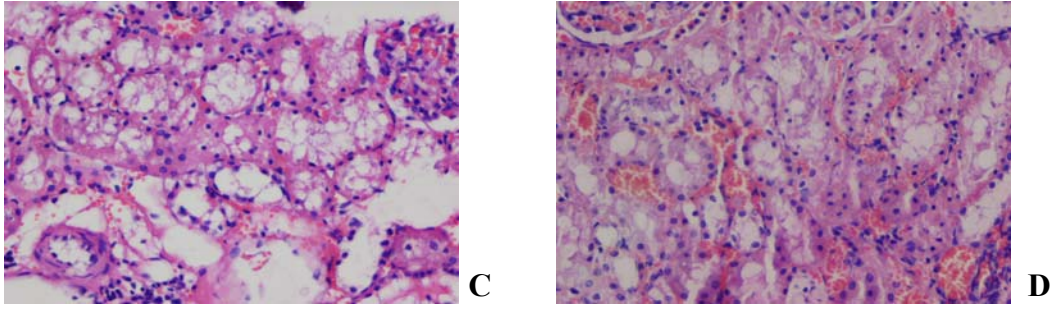
Skor 4: Tübüllerin üst 2/3 ünden fazlasında hasarlanma ve nükleer kayıp olması durumu.



A



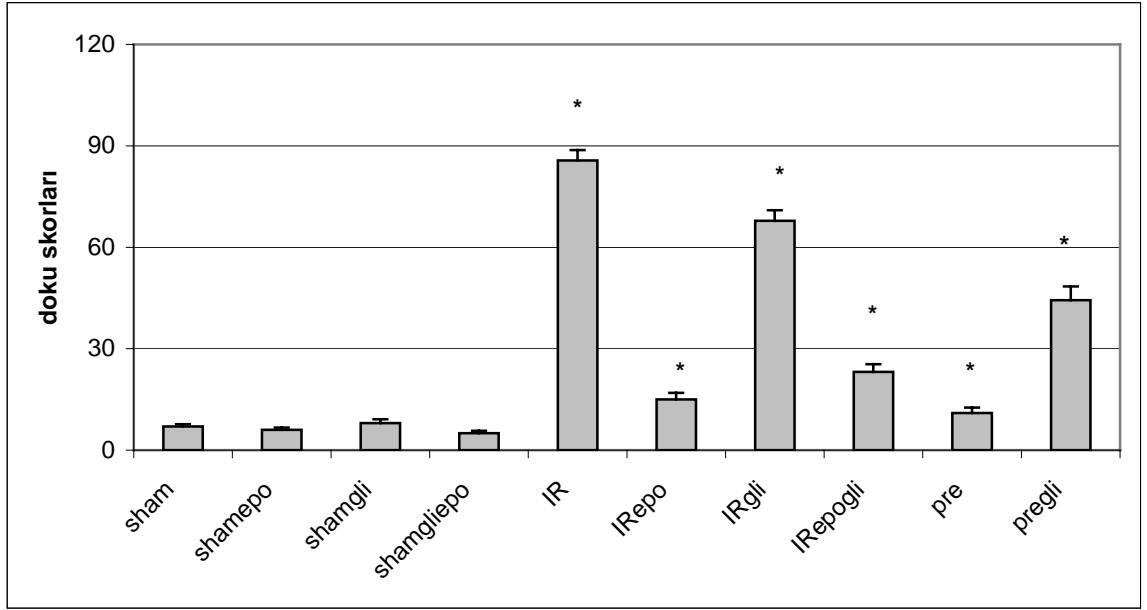
B



Şekil 3.1: Grupların değerlendirilmesinde kullanılan skorlamaya örnek böbrek dokuları. A: normal histoloji, B: skor 1, C: skor 2, D: skor 3

Sham grubunun doku skorları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Glibenklamid verilen grupta doku hasar skoru artmış olsa da istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.

I/R grubunun tübüler hasar skorları; sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artmış bulunmuştur ($p < 0.001$). I/R-EPO, I/R-glibenklamid (I/Rgli), I/R-önşartlanma (pre), I/R-glibenklamid-önşartlanma (pregli) gruplarında tübüler hasar skorları sham grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). I/R hasarı öncesi EPO tedavisi, önşartlanma ($p < 0.001$) ve glibenklamid tedavisi ($p < 0.05$); I/R ye bağlı böbrek hasarını azaltmıştır. Glibenklamid tedavisi; hem EPO tedavisine hem de önşartlanmaya bağlı düzelmeyi azaltmaktadır ($p < 0.001$) (Şekil 3.2). (Sham: $7,1 \pm 0,7$; shamepo: $6,4 \pm 0,9$; shamgli: $8,3 \pm 0,9$; shamgliepo: $7,6 \pm 0,7$; IR: $86,6 \pm 3,7$; IRepo: $15,4 \pm 1,7$; IRgli: $67,8 \pm 3,9$; IRepogli: $23,6 \pm 2,3$; pre: $11,9 \pm 1,7$; pregli: $44,3 \pm 4,7$).



Şekil 3.2: Histopatolojik inceleme sonucunda her bir gruptan elde edilen skorlar.

Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir (n=6)

* Sham grubu ile $p < 0.001$ istatistiksel olarak anlamlı farkları olan grupları ifade etmektedir

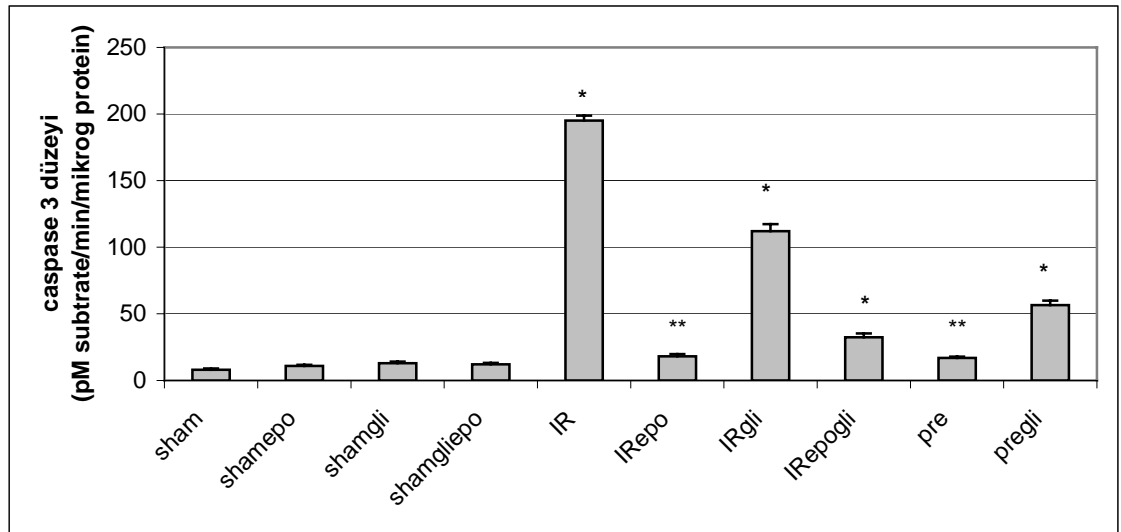
3.2. Apoptosis Sonuçları:

I/R hasarı sonrası böbrek dokusunda kaspaz-3 düzeyi artmıştır ($p<0.001$, $n=10$). EPO, glibenklamid tedavisinin tek başlarına ve kombine kullanımları ve önşartlanma I/R sonrası hasarı belirgin şekilde azaltmıştır ($p<0.000$).

EPO tedavisi ve önşartlanma I/R sonrası hasar kontrol düzeyine yaklaşmıştır ($p<0.05$).

Glibenklamid tedavisi; I/R sonrası hasarı azaltmış olmasına rağmen; EPO ve önşartlanma grubundaki koruyucu etkiyi de azaltmış bulunmuştur ($p<0.001$).

Sham grubuna EPO, glibenklamid, EPO ve glibenklamid beraber uygulanmasının böbrek apoptosisine etkisi anlamlı bulunmamıştır. Sham: $8\pm0,9$; shamepo: $11\pm0,8$; shamgli: $13\pm1,9$; shamgilepo: $12\pm1,7$; IR: $195\pm3,7$; IRepo: $18\pm1,8$; IRgli: $112\pm5,9$; IRepogli: $32\pm2,9$; pre: $17\pm1,1$; pregli: $56\pm4,2$ (Şekil 3.3)



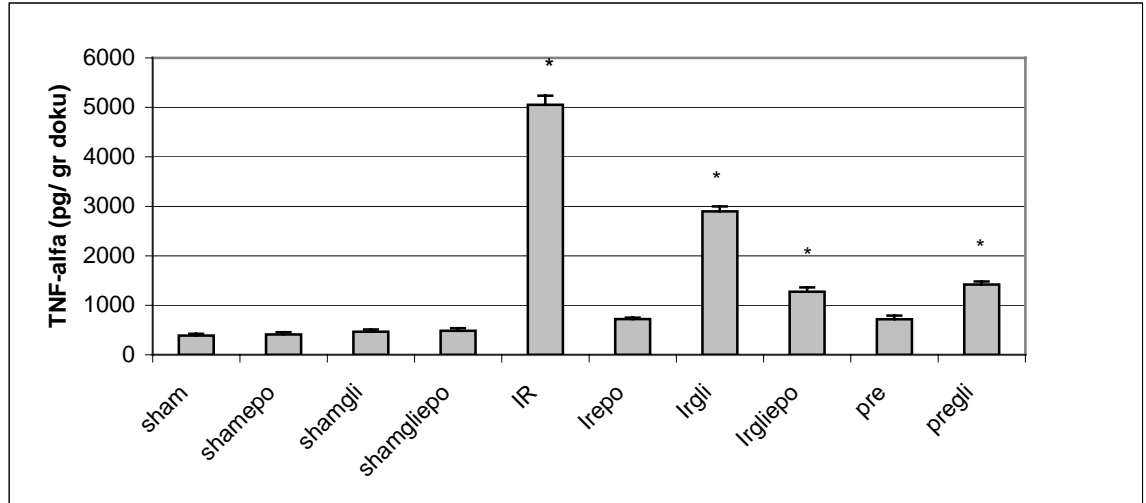
Şekil 3.3: I/R hasar sonucu apoptosis değerlendirilmesi, grupların doku kaspaz-3 düzeyleri: Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir ($n=10$). Sham grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farkları olan gruplar * $p<0.001$, ** $p<0.05$ olarak gösterilmiştir.

3.3. Doku Sitokin Düzeyleri:

3.3.1. TNF- α Düzeyi

I/R hasarı sonrası, böbrek dokusunda proinflatuvar sitokin TNF- α düzeyi artmıştır ($p<0.001$, $n=10$). EPO tedavisi ve önşartlanma I/R sonrası TNF- α düzeyi artışını belirgin şekilde azaltmıştır ($p<0.001$), bu gruplar ve kontrol grubu arasında ise istatistiksel fark bulunamıştır. Glibenklamid tedavisi; I/R sonrası TNF- α düzeyini azaltmış olmasına rağmen; EPO ve önşartlanma grubundaki TNF- α düzeyi artmasına neden olmuştur ($p<0.001$).

Sham grubuna EPO, glibenklamid, EPO ve glibenklamid beraber uygulanmasının böbrek TNF- α düzeyine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.4). (Sham: 386 ± 38 ; shamepo: 411 ± 42 ; shamgli: 465 ± 47 ; shamgliipo: 489 ± 52 ; IR: 5053 ± 183 ; IRepo: 721 ± 30 ; IRgli: 2898 ± 101 ; IRepogli: 1275 ± 88 ; pre: 717 ± 75 ; pregli: 1418 ± 62 pg/ml).

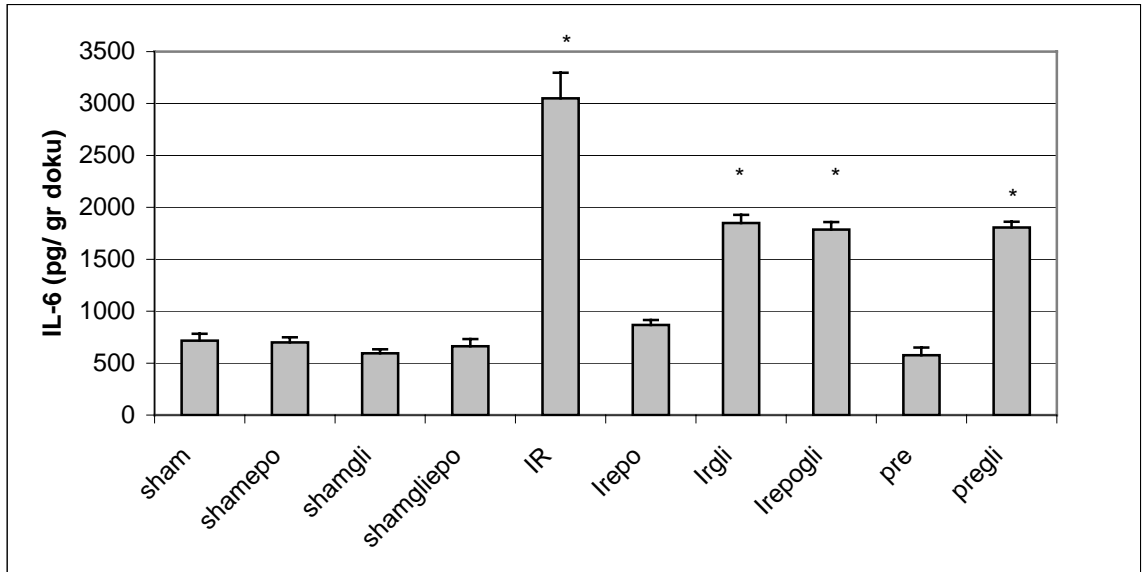


Şekil 3.4: Doku TNF- α düzeyleri . Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Sham grubu ile $p<0.001$ istatistiksel olarak anlamlı farkları olan grupları ifade etmektedir

3.3.2. Doku IL-6 Düzeyleri:

I/R hasarı sonrası böbrek dokusunda proinflamatuvar sitokin IL-6 düzeyi artmıştır ($p<0.001$, $n=10$). EPO tedavisi ve önşartlanma I/R sonrası IL-6 düzeyi artışını belirgin şekilde azaltmıştır ($p<0.001$). Glibenklamid tedavisi; I/R sonrası IL-6 düzeyini azaltmış olmasına rağmen; EPO ve önşartlanma grubundaki IL-6 düzeyi artmasına neden olmuştur ($p<0.001$).

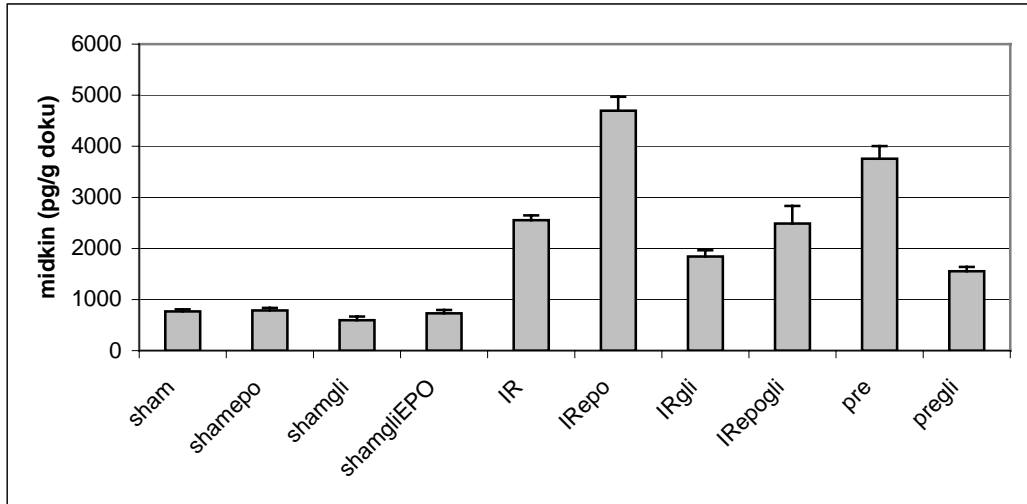
Sham grubuna EPO, glibenklamid, EPO ve glibenklamid beraber uygulanmasının böbrek IL-6 düzeyine etkisi görülmemiştir. EPO tedavisi ve önşartlanma sonrası doku IL-6 düzeyleri sham grubu düzeylerine yaklaşık değerlere düşmüştür. (Sham: 716 ± 66 ; shamepo: 700 ± 47 ; shamgli: 595 ± 39 ; shamgliipo: 663 ± 65 ; IR: 3050 ± 246 ; IRepo: 868 ± 47 ; IRgli: 1850 ± 78 ; IRepogli: 1786 ± 72 ; pre: 577 ± 74 ; pregli: 1806 ± 52 pg/gr)



Şekil 3.5: Doku IL-6 düzeyleri . Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Sham grubu ile $p<0.001$ istatistiksel olarak anlamlı farkları olan grupları ifade etmektedir.

3.4. Doku Midkin Düzeyleri:

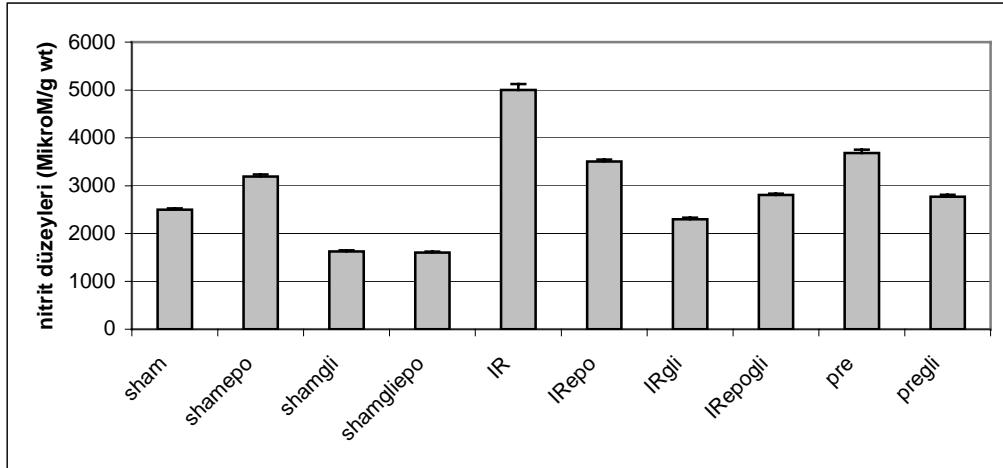
EPO ve glibenklamid uygulanan hayvanların böbrek dokularında midkin düzeyleri kontrole göre anlamlı farklı bulunmamıştır. I/R hasarı dokuda midkin düzeyini arttırmıştır ($p<0.001$). EPO uygulanan I/R grubunda midkin düzeyi artarken ($p<0.001$), glibenklamid uygulaması I/R sonrası midkin düzeyini azaltmıştır ($p<0.001$). Önşartlanma grubunda da EPO grubuna benzer etkiyle I/R grubuna göre midkin düzeyi artmış ve artış da glibenklamid uygulaması ile azalmıştır ($p<0.001$). Şekil 3-6' de tüm gruplara ait böbrek dokusu midkin düzeyleri görülmektedir. (Sham: 766 ± 41 ; shamepo: 786 ± 51 ; shamgli: 596 ± 71 ; shamgliEPO: 731 ± 61 ; IR: 2552 ± 98 ; IRepo: 4697 ± 271 ; IRgli: 1840 ± 128 ; IRepogli: 2486 ± 376 ; pre: 3755 ± 248 ; pregli: 1552 ± 86 pg/ml).



Şekil 3.6: Doku midkin düzeyleri . Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Sham grubu ile $p<0.001$ istatistiksel olarak anlamlı farkları olan grupları ifade etmektedir.

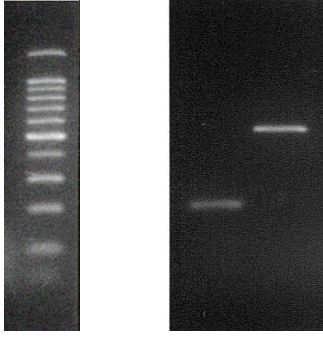
3.5. Doku Nitrit Düzeyleri:

EPO verilen sağlıklı hayvanlarda böbrek dokusu nitrit düzeyi kontrole göre artmış, glibenklamid verilen grupta ise azalmış bulunmuştur ($p<0.05$). I/R uygulanan grupta doku nitrit düzeyi sham grubuna göre belirgin şekilde artmıştır ($p<0.000$). hem EPO tedavisi hem de glibenklamid uygulaması doku nitrit düzeyini azaltmıştır, bu etki glibenklamid grubunda daha belirgindir ($p<0.001$). Şekil 3.7' de tüm gruplara ait böbrek dokusu nitrit düzeyleri görülmektedir. (Sham: 2496 ± 26 ; shamepo: 3191 ± 43 ; shamgli: 1626 ± 22 ; shamgliipo: 1601 ± 31 ; IR: 5003 ± 121 ; IRepo: 3505 ± 42 ; IRgli: 2296 ± 33 ; IRepogli: 2296 ± 37 ; pre: 3681 ± 72 ; pregli: 2771 ± 39 $\mu\text{M/g}$ doku).

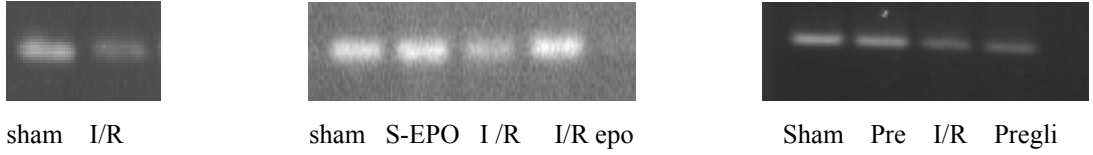


Şekil 3.7: Doku nitrit düzeyleri : Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

3.6.Doku mRNA Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi:



Şekil 3.8: Sham grubu böbrek dokusunda HIF-1 α ve β -aktin mRNA ekspresyonları ve moleküler ağırlık standartı. HIF-1 α ve β -aktin mRNA ekspresyonları yaklaşık olarak sırasıyla moleküler ağırlık standartının 200 ve 500 bp a denk gelen bölgelerinde görülmüştür.



Şekil 3.9: Dokularda HIF-1 α mRNA ekspresyonları (n=3): I/R hasarı böbrek dokusundan HIF-1 α mRNA ekspresyonunu azaltırken EPO ve önşartlanma HIF-1 α ekspresyonunu arttırmıştır. Glibenklamid uygulaması her iki tedavinin HIF-1 α mRNA üzerindeki arttırıcı etkisini azaltmıştır. Şekil 3.8'de sham, sham-EPO, I/R-EPO, önşartlanma, önşartlanma glibenklamid gruplarındaki HIF-1 α mRNA ekspresyonları görülmektedir.

3.7. Kardiyο- Renal Fonksiyonların Değerlendirilmesi:

Deney boyunca kuyruktan sistolik kan basıncı tayini ve kalp hızı ölçümü 4 kez yapılmıştır, ortalaması alınarak değerlendirilmeye katılmıştır. Deney sonlandırıldığında glomerüler ve tübüler fonksiyonları değerlendirebilmek için kan örneği alınmış ve deney süresince toplanan idrar örnekleri ile beraber üre, kreatinin, Na, K, düzeyleri ölçümünde kullanılmıştır. Elde edilen değerler kreatinin klerensi, fraksiyone Na ve K atılımı hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.7.1. Gruplara Göre Sistolik Basıncı, Kalp Hızı, Kan Glukoz Düzeyleri:

Sham grubunda EPO ve glibenklamid uygulaması sistolik kan basıncı (SP) ve kalp hızı (HR) üzerinde değişiklik yaratmamıştır. I/R grubunda, SP ve HR sham grubuna göre belirgin şekilde artmıştır ($p<0.01$). I/R sırasında EPO tedavisi yükselen kan basıncını ve artmış kalp hızını azaltmıştır ($p<0.05$). Önşartlanma; I/R ya bağlı SP ve HR değerlerini sham grubuna yaklaştırmışken, glibenklamid uygulaması hem EPO' nun hem de önşartlanmanın SP ve HR üzerindeki etkisini azaltmıştır.

Kan glukoz düzeyi EPO uygulamasında değişiklik göstermemiş olmasına rağmen glibenklamid tedavisi sonrası düşmüştür ($p<0.05$). I/R grubunda deney sonunda kan glukoz düzeyi kontrole göre yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). I/R sonrasındaki artan kan glukoz düzeyi; EPO, glibenklamid, önşartlanma uygulaması ile azalma göstermiştir ($p<0.05$). Grupların SP, HR ve serum glukoz düzeyleri tablo 4 de verilmiştir.

Tablo.4: Gruplara göre sistolik basınç, kalp hızı, kan glukoz düzeyleri: Sonuçlar ortalama± SD olarak verilmiş, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Grup	Sistolik basınç SP (mmHg)	Kalp hızı HR (atım/dk)	Glukoz (mg/dl)
Sham	120±13	270±33	210±23
Sham-EPO	117±14	256±26	234±45
Sham-gli	123±16	285±38	134±27
Sham-EPO-gli	121±19	271±26	194±45
I/R	195±17	420±36	478±43
I/R-EPO	146±12	345±44	286±38
I/R-gli	171±13	401±36	312±34
I/R-EPO-gli	148±12	396±43	297±43
Önşartlanma	135±21	370±40	276±56
Önşartlanma-gli	181±16	412±45	321±65

3.7.2. Glomerüller ve Tübüler Fonksiyonların Değişimleri:

Sham opere gruba EPO uygulanması serum üre ve kreatinini anlamlı olarak değiştirmedeği halde glomerüller filtrasyon hızını (GFR) arttırmıştır (p<0.05). Aynı gruba glibenklamid tek başına uygulandığında ise serum üre ve kreatinin düzeyleri artmış, GFR ise azalmış bulunmuştur (p<0.05). EPO ve glibenklamid beraber uygulanan sham grubunda ise böbrek fonksiyonları normale yakın bulunmuştur.

I/R sonrası böbrekteki hasarlanma böbrek fonksiyonlarına da yansımıştır. Serum üre, kreatinin düzeyi kontrole göre yaklaşık 2-3 kat artmıştır (p<0.001). GFR sham grubuna göre azalmıştır (p<0.001). I/R hasarından önce EPO uygulanması

serum üre, kreatinin düzeylerini kontrol grubuna yakın değerlere ulaştırmış, GFR düzeyini de istatistiksel olarak anlamlı arttırmıştır. I/R hasarı öncesi glibenklamid uygulanan grupta serum üre düzeyi ve GFR düzeyi I/R grubuna göre farklılık göstermediği halde serum kreatinin düzeyi azalmış bulunmuştur ($p<0.05$).

Önşartlanma I/R ye bağlı serum üre ve kreatinindeki artışı azaltmış, I/R sonrası GFR’deki azalmayı da kontrole yakın değerlere getirmiştir ($p<0.001$). Glibenklamid uygulaması hem I/R öncesi EPO uygulamasının hem de önşartlanmanın etkilerini azaltmıştır.

EPO ve/veya glibenklamid uygulaması sham grubunda fraksiyone Na (Frak Na (%)) ve K atılım yüzdelerinde (Frak K (%)) anlamlı değişiklik yaratmamıştır. I/R hasarı hem Frak Na hem de K yüzdelerini arttırmıştır. I/R öncesi EPO uygulaması her iki değeri de düşürürken ($p<0.05$), glibenklamid uygulanan grupta I/R değerleriyle benzer sonuçlar elde edilmiştir. Önşartlanma sonrası normal değerlere yaklaşan fraksiyone Na ve K atılımını glibenklamid uygulaması I/R değerlerine benzer şekilde arttırmıştır.

Tübüler ve glomerüler fonksiyonlardaki değişim tablo.5 de gösterilmiştir.

Tablo 5: Gruplara göre renal fonksiyonların değerleri: Sonuçlar ortalama± SD olarak verilmiş, p<0.05 istatikselsel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Grup	Üre	Kreatinin	GFR (ml/dk)	Frak Na (%)	Frak K (%)
Sham	34±13	0.86±0.33	0.99±0.33	0.89 ±0.76	23±5
Sham-EPO	27±14	0.71±0.26	1.48±0.26	0.93 ±0.36	27±6
Sham-gli	54±16	1.34±0.38	0.54±0.38	1.12 ±0.56	21±8
Sham-EPO-gli	41±19	0.98±0.26	0.98±0.26	1.03±0.37	22±6
I/R	75±17	2.32±0.36	0.32±0.36	2.75±0.98	43±5
I/R-EPO	56±12	1.15±0.44	0.75±0.44	1.34±0.83	33±8
I/R-gli	66±13	1.87±0.36	0.37±0.36	2.93±0.58	45±9
I/R-EPO-gli	68±12	1.45±0.43	0.45±0.43	1.89±0.33	37±6
Önşartlanma	45±21	1.12±0.40	0.82±0.40	1.33±0.21	33±6
Önşartlanma-gli	61±16	1.42±0.45	0.62±0.45	2.13±0.33	37±8

4. TARTIŞMA

Eritropoietinin hematopoezdeki rolü ve dolaşımdaki EPO' nun başlıca kaynağının böbrek olduğu ve endokrin fonksiyonları uzun yıllardır bilinmektedir. EPO yapımının ve reseptörlerinin böbrek dışı dokularda da olduğunun gösterilmesiyle beraber EPO'nun başka etkileri olabileceği düşünülerek endokrin etkilerinin yanısıra parakrin etkileri de çalışılmaya başlanmıştır. Hipoksiyle ve metabolik stresle yapımı uyarılan EPO'nun koruyucu etkisinin gösterildiği en önemli mekanizma I/R hasarıdır. EPO'nun kardiyak, gastrointestinal, nöronal sistem gibi pek çok doku ve hücrede iskemik, metabolik ve oksidatif hasarda koruyucu olduğu bulunmuştur. Son yıllarda bu koruyucu etkinin renal sistem üzerinde de geçerli olduğu gösterilmiştir. EPO tedavisi iskemiden önce tek doz kullanıldığında dahi renal toksititede, akut iskemik yetmezliklerde ve iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu bulunmuştur (Bagnis ve ark. 2001, Vesey ve ark. 2004, Spandou ve ark. 2006). Yeni çalışmalarla gerek iskemi-reperfüzyon hasarı oluş mekanizmalarına gerekse EPO'nun bu süreçteki koruyucu etkisini açıklamaya yönelik yeni bilgiler eklenmektedir. Bu konuda tartışmalı olan mekanizmalardan birisi K kanallarının iskemik olaya katılımıdır. EPO'nun kardiyak I/R hasarında koruyucu etkisinde K-ATP kanallarının aktivasyonunun önemli olduğu bulunmuştur (Joyeux-Faure ve ark. 2006, Hanley ve Daut 2005), oysa renal I/R hasarında K-ATP kanal inhibitörü uygulamasının I/R hasarından koruyucu olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Pompermayer ve ark. 2005). Bu çalışmanın amacı I/R hasarı öncesi tek doz EPO uygulamasının renal I/R hasarına etkisi, bu etkide K-ATP kanallarının katkısının açığa çıkarılmasıdır.

Çalışmada kısa süreli (45 dk) iskemi renal arter ve ven iki taraflı klemplenerek uygulanmış ve hayvanlar reperfüzyondan sonra 4 saat takip edilmiştir. EPO, önşartlanma ve/ veya glibenklamid uygulaması; I/R hasarından 30 dk önce yapılmıştır. Kırk beş dk süreli iskemi ve 4 saatlik reperfüzyon renal dokuda tübüler hasar oluşturmaya yeterli olmuştur. Histopatolojik ve biyokimyasal olarak

değerlendirildiğinde I/R grubunda doku hasarı artmış bulunmuştur. EPO tedavisi uygulanması ile sham grubunda histopatolojik incelemeler ve sitokin düzeyleri arasında fark bulunmadığı halde bu grupta SP ve HR değişmeksizin GFR artmış bulunmuştur. EPO verilen grupta doku nitrit düzeyleri de diğer gruplara göre daha yüksektir. Vaziri ve ark. (1995) normal sıçanlarda tek doz EPO enjeksiyonu sonrası kardiovasküler ve renal parametrelerde değişiklik bulamamış Tojo ve ark. (1996) 1000 IU/kg EPO enjeksiyonunun hipertansif sıçanlarda vazokonstriksiyona ve kan basıncı artışına neden olduğunu, normal sıçanlarda kan basıncında hafif bir düşme yaparken GFR' de değişiklik yapmadığını bulmuşlardır. Panzacchi ve ark. (1997) ise EPO tedavisinin renal kan akımında artışa neden olarak GFR' de artışa yol açtığını göstermişlerdir. del Castillo ve ark. (1995) EPO uygulamasının endotelde ve böbrekte NOS yapımını arttırdığını göstermişlerdir. Daha önce yapılan çalışmamızda (Uzuner ve Yazihan, 2004) tek doz EPO uygulamasının GFR' de artışa neden olduğu, bu etkinin NOS blokörü L-NAME ve NMDA R blokörü ketamin ile bloke olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Her iki çalışmada da böbrek nitrit düzeyleri artmıştır. Nitekim bu çalışmada sham grubunda EPO uygulanan grupta GFR' deki artış doku nitrit düzeylerindeki artış ile korele bulunmuştur.

I/R grubunda doku nitrit düzeyi diğer gruplara göre anlamlı artış göstermiştir. Bu grupta pro-inflamatuvar sitokin TNF- α ve IL-1 β düzeyleri de yükselmiştir. Artmış inflamasyon I/R hasarı gelişiminde önemli mekanizmalardandır. I/R' ye bağlı dokuya kan akımı artışı ve endotel hasarı gelişimiyle beraber dokuya lökosit ekstrasvazasyonu da artmaktadır. Ortamda biriken lökosit ve makrofajlar aktive olmakta, dokuda nitrit yapımı ve sitokin salınımı artmaktadır. Bu durum birbirlerini tetikleyen olayların aktive olmasını ve sürekliliğini sağlamaktadır. Vazodilatör etkisi bulunan NO' daki artış da, reperfüzyon sırasında kan akımının artmasına neden olarak I/R hasarında artışa katkıda bulunabilir.

Doku nitrit düzeyleri gerek EPO verilen grupta gerekse önşartlanma uygulanan gruplarda I/R grubuna göre daha düşük olmasına rağmen, glibenklamid uygulanan gruba göre daha yüksektir. I/R hasarından önce EPO ve önşartlanma

grubunda glibenklamidin beraber uygulanması her iki grupta da doku nitrit düzeylerinin azalmasına neden olmuştur. K-ATP kanalları aynı zamanda hipokside aktive olan iyon kanallardır. Hipoksik ve hipoglisemik koşullarda oluşan vazodilatasyona K-ATP kanallarının aracılık ettiği gösterilmiştir. I/R hasarından önce glibenklamid uygulanan grupta K-ATP kanallarının blokajına bağlı reperfüzyon sırasındaki vazodilatasyon da azalmış olabilir. Bu durum ortamda inflamatuvar hücrelerin toplanmasını ve dolayısıyla pro-inflamatuvar sitokin düzeyini azaltmış olabilir. Olasılıkla buna bağlı olarak doku nitrit düzeyi de I/R grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Glibenklamid uygulanan I/R grubundaki rölatif iyileşme nedeni K-ATP kanal blokajına bağlı vazokonstriksiyon nedeniyle olabileceğini düşündürmektedir. Bu grupta kaspaz-3 düzeyi de I/R grubuna göre daha az bulunmuştur.

NO' nun; vazodilatasyon yaparak, hipoksik dokuya kan akımını arttırmasının yanısıra dokuda HIF-1 aktivasyonunu inhibe edici etkisi de mevcuttur. HIF-1 hücre içine glukoz transportunu stimüle eder. Hipoksik koşullarda hücrenin enerji gereksiminde oksidatif fosforilasyondan ziyade glikolitik yola gidiş söz konusudur. Bu olay hücrenin hipoksiye adaptasyonunda oldukça önemlidir (Faton ve ark. 2000). NO böbrekte oksijen kullanımının kontrolünde ve böbreğin kimyasal işlerinin düzenlenmesinde önem taşır. NO sentezini uyaran maddelerin böbrek tubullerinde her bir Na⁺ emilimi için gerekli olan ATP miktarını azalttığı da gösterilmiştir. NO sıçan kalp ve iskelet kas mitokondrilerinde sitokrom c aktivitesini inhibe etmektedir (Laycock ve ark. 1998). Böbrekte Na⁺-K⁺ ATP az aktivitesi en çok enerji gerektiren olaydır. Sodyumun geri alımı için gerekli enerji ve yapılan iş doğrudan böbreğin sarf ettiği oksijen miktarıyla ilişkilidir ve böbreğin oksijen gereksimini belirler. Noradrenalin ve bradikinin gibi böbrekte NO salınımına neden olan maddeler, kortikal ve medullar O₂ kullanımını azaltırken, L-NAME gibi NOS blokörleri her bir Na⁺ için harcanan ATP miktarını arttırmaktadırlar (Blantz ve ark. 2002, Laycock ve ark. 1998). EPO ve önşartlanma uygulaması sırasında beliren koruyucu etkide, artan NO' nun böbrek tübül fonksiyonlarında enerji kullanımını düzenleyici etkisinin katkısı olabilir.

Kaspaz-3, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun bozulmasını takiben sitokrom c yapımının artması ve sitozolde düzeyinin artmasıyla aktive olan apoptotik yolun en önemli göstergelerindedir. I/R grubunda apoptosis göstergesi olan kaspaz-3 düzeyi de sham grubuna çok yüksek bulunmuştur. I/R hasarı sürecinde hem EPO tedavisi uygulamasının hem de K kanal inhibitörü olan glibenklamid uygulamasının kaspaz-3 düzeyini düşürmüş olması ve diğer parametreleri de kontrol grubuna yaklaştırmış olması ilginçtir. Önşartlanma uygulanan grupta da I/R grubuna göre çok belirgin düzelmeye gözlenmiştir. EPO ve önşartlanma tedavisinin I/R sonrası hasara etkisi benzer düzeylerde dir. Glibenklamid uygulanması tek başına I/R hasarını azaltmışsa da bu düzey EPO ve önşartlanma gruplarında olduğu kadar belirgin değildir , ayrıca glibenklamid uygulaması EPO ve önşartlanma ile beraber uygulandığında her iki gruptaki düzelmeyi de inhibe ettiği gözlenmiştir.

HIF-1 α ; iskemiye adaptasyonu sağlayan VEGF, glukoz metabolizmasında yer alan enzimler gibi çok sayıda genin aktivasyonu, pek çok molekülün ekspresyonunun başlamasında rol alan önemli bir moleküldür. EPO uygulanan ve önşartlanma uygulanan gruplarda HIF-1 α mRNA ekspresyonu da artmıştır. I/R grubunda ise HIF-1 α mRNA ekspresyonu sham grubuna göre azalmış bulunmuştur. EPO yapım ve uyarımının HIF-1 α sekresyonu sonrası aktive olduğu ve bu şekilde iskemik hasara karşı koruyucu düşünülmektedir. Önşartlanmada da EPO/HIF yolu çok önemlidir. Nöronal hipoksik hasarda EPO yapımını takiben JAK2' nin fosforile olduğu ve NF κ B bağımlı endojen anti-apoptotik XIAP ve cIAP-2 genlerinin yapımının arttığı gösterilmiştir (Digicaylioglu ve Lipton 2001).

EPO ve önşartlanmanın iskemik hasardan koruyucu etkisinde sadece NF κ B değil protein kinaz B ve akt/ PI3K hücre içi sinyal yolları da katılmaktadır. K-ATP kanalları; akt/ PI3K sinyal yollarının aktivasyonunda çok önemlidir (Rafiee ve ark. 2005). EPO ve önşartlanma sonrası koruyucu etkinin ve HIF-1 α mRNA ekspresyonunun glibenklamid uygulaması ile azalması bu etkide K-ATP kanal blokajının önemli olduğunu düşündürmektedir. K kanalları özellikle K-ATP kanalları önşartlanmada aktive olan önemli mekanizmalardan biridir. Çalışmamız sırasında da önşartlanmanın renal I/R hasarında koruyucu olduğu, bu etkinin K-ATP kanal

blokörü glibenklamid ile inhibe olduğu bulunmuştur. Bu etki hem histopatolojik bulgularla, hem inflamatuvar sitokin düzeylerindeki değişimlerle hem de glomerüler ve tübüler fonksiyon değerlendirmeleriyle desteklenmiştir.

Özellikle tübüler fonksiyonları düşünüldüğünde oksijene çok hassas olan bu hücreler ortamın pH'ı, metabolik artıklar, ATP miktarı ve en önemlisi PO₂ de değişimlerden önemli derecede etkilenirler. K kanallarının hücrede etkileri hücre membranında olmasına veya mitokondriyal membranda yer almasına göre değişir. Hücre membranındaki K kanallarının kapanması ile hücre depolarize olur ve hücre içi kalsiyum miktarı artarken, mitokondriyal K kanalları mitokondrinin iç membranında bulunup matriks volumü, matriks kalsiyum miktarı ve solunum hızını kontrol eder. (Hanley ve Daut, 2005). EPO' nun önşartlanma benzeri bir etki göstererek renal I/R hasarından koruyucu etkisinde ATP bağımlı K kanalları etkin olabilir.

Midkin heparin bağlayan multifonksiyonel faktördür. Böbreğin I/R hasarında önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Midkin, hücre yaşamını uzatır, mitojenik etki gösterir, nöronların, nötrofillerin ve makrofajların migrasyonunu uyarır, fibrinolitik aktiviteyi artırır (Sato ve ark., 2001). Böbrekte I/R hasarı oluşturulduğunda proksimal tübüllerde midkin ekspresyonunun üç kat arttığı bulunmuştur. Midkin +/- farelerde I/R hasarının daha az olduğuna dair yayınlar olsa da; inmeye bağlı ölen hastaların postmortem çalışmalarında midkin ekspresyonunun daha fazla olduğu alanlardaki dokuların diğer alanlara göre daha iyi durumda olduğu bu nedenle de midkin ekspresyonunun iskemik ve inflamatuvar hasardan koruyucu olabileceği düşünülmüştür (Lien ve ark., 2003, Wada ve ark., 2002). Bu çalışmalar; I/Rhasarından günler sonra yapılan değerlendirmelerdir. Çalışmada midkin +/+ farelerde MCP-1 ve IL-8 gibi kemokin ve kemoatraktan moleküllerin düzeyi daha yüksek bulunmuşken, midkin +/- farelerde bu molekül düzeyleri daha düşük bulunmuştur (Sato ve ark., 2002). Bizim çalışmamızda da I/R hasarı olan böbrek dokusunda midkin düzeyinin kontrol gruplarına göre I/R hasarını takiben 4 saat içinde artmış olduğu bulunmuştur. EPO tedavisi ve önşartlanma uygulanan gruplarda ise bu artış daha belirgindir. Glibenklamid uygulaması bu gruplarda midkin doku

düzyeyini azaltmıştır. Bu durum I/R sırasındaki doku midkin artışının sadece nötrofil ve makrofaj aktivasyonu değil, dokularda anti-apoptotik etki de göstererek koruyucu olabileceğini de düşündürmektedir. Fakat alışmamızda I/R sonrası uzun dönem takip yapılmamıştır. İlginç olan böbrek dokusunda normal koşullarda da yoğun midkin sekresyonunun varlığının gözlenmesidir. Midkinin farklı dokularda, normal ve patolojik koşullardaki etkileriyle ilgili çalışma yok denecek kadar azdır.

Sato ve ark. (2001); böbrek proksimal tüböl hücre költürü çalışmalarında 5 mM H₂O₂ uygulamasının midkin sekresyonunu bir saat içinde arttırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde insan hepatosit hücre dizisi Hep3B ile yaptığımız hücre költürü çalışmalarında 100µM H₂O₂ uygulaması sonrasında hücrelerden midkin salınımının arttığı ve bu artışında K-ATP kanal blokajı ile inhibe olduğu bulunmuştur. Gene aynı çalışma kapsamında 100µM H₂O₂ uygulanan gruba farklı dozlarda midkin uygulandığında midkin uygulanan gruplarda H₂O₂ ' ye bağlı hasarın daha az olduğu bulunmuştur. Midkin uygulaması bu hücrelerde anti-apoptotik etki göstermiştir (Yazıhan ve ark, 2007). Bu durum midkinin oksidatif hasardan hücreyi koruyucu olduğunu düşündürmüştür. I/R hasarı sırasında artmış oksidatif hasar dokudan midkin sekresyonunu arttırmış olabilir.

İnflamatuvar süreç I/R hasarının gelişiminde önemli bir mekanizmadır. Daha önce yapılmış pek çok çalışmada EPO' nun, I/R hasarından anti-apoptotik, anti-inflamtuvar etki göstererek koruyucu olduğu gösterilmiştir (Brines ve Cerami, 2005). Örneğin serebral korteks I/R hasarında, EPO'nun etkisinin TNF-α yapımını azaltarak primer hasarı azalttığı, bu şekilde de inflamasyonu baskılayarak ileri dönemde sekonder hasarı engellediği gösterilmiştir. Başka iskemi ve inflamatuvar deney modellerinde de EPO'nun doğrudan inflamatuvar sitokin yapımını azalttığı saptanmıştır. TNF-α ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin yapım artışı renal I/R hasarı oluş mekanizmasında önem taşımaktadır. Bu çalışmada; dokuda bazal bir sitokin sekresyonunun olduğu, bu düzeyin sham grubuna EPO ve/veya glibenklamid uygulamasıyla değişmediği fakat I/R hasarını takiben dokuda TNF-α ve IL-6 düzeylerinin belirgin arttığı bulunmuştur. EPO, renal I/R hasarında da TNF-α ve IL-6 düzeylerini azaltarak anti-inflamatuvar etki göstermektedir. Öñartlanma uygulanan

grupta da benzer sonuçlar elde edilmiş ve her iki grubun anti-inflamatuvar etkisi K-ATP kanal blokajıyla inhibe edilmiştir. Akt ve PK C hücre içi iletim yolları K-ATP kanal aktivasyonu ile yakından ilişkili yollardır. Hüce içindeki mekanizmalar aktive olduğunda başka yolları da aktive edebilmektedir. Jak2/STAT yolu ve takiben NFκB uyarımı da bunlara dahildir. Her iki sinyal iletiminin EPO ve önşartlanma ile aktive olduğu bilinmektedir. K-ATP blokajı, EPO ve önşartlanmaya bağlı anti-inflamatuvar etkiyi bu yolların blokajıyla yapıyor olabilir.

Glibenklamid uygulanan grupta I/R sonrası inflamatuvar sitokin düzeyleri azalmıştır. K-ATP kanalları nötrofil ve makrofaj aktivasyonunda önemlidir. İnflamatuvar hücre aktivasyonu ile sitokin yapımı artmakta ve hücre hasar belirginleşmektedir. Glibenklamidin nötrofil aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. İnflamatuvar olaylardaki diğer dolaylı bir etkisi de vazokonstriksiyon yaratarak vasküler permeabiliteyi azaltarak, dokuya geçen inflamatuvar hücre sayısını düşürmesidir. Vasküler permeabilitede azalma ve vazokonstriksiyon ; reperfüzyona bağlı oksidatif stresi de azaltmaktadır. Aynı mekanizma renal I/R hasarında da geçerlidir. Pompermayer ve ark. (2005) glibenklamid uygulamasının renal I/R hasarını antioksidan ve anti-inflamatuvar etkiyle azalttığını ve bu etkide NFκB translokasyonunun inhibisyonunun da yer aldığını göstermişlerdir. Bu çalışma bizim çalışmamızda elde edilen bulguları destekleyicidir.

Renal I/R hasarı sırasında iskemi döneminde böbrek korteks ve medullasına olan kan akımı kesilmekte, reperfüzyonu takiben doku kanlanması hızla sağlanmaktadır. Fakat reperfüzyon sırasında böbrek dokusunda her bölgede eşit kanlanma olamamakta, bazı bölgeler iskemik kalırken bazı bölgelerde konjesyon ve ödem gelişimi gözlenmektedir. Böbrek dokusundaki hemodinamik bozulma, vazomotor aktivitede de denge bozukluğuna neden olmaktadır. I/R hasarlı dokuda lokalize veya jeneralize cevaplar oluşarak, endotelin-1 , PAF, prostaglandinler gibi bazı vazokonstriktör maddelerin yapımının artmasının yanısıra; inflamatuvar sitokin , kemokinler, NO gibi moleküller de devreye girerek yer yer vasküler konjesyonlar oluşabilmektedir. Endotel hasarının artmasıyla da ödem gelişimi hızlanmaktadır (Devarajan, 2006).

Oksijen yetersizliğine bağlı olarak tübüler hücrelerde ATP yapımı azalarak AMP düzeyi artmaktadır. Hasarlanan hücrelerden adenin nükleotidler hücre dışına çıkmaya başlamaktadır. Özellikle reperfüzyon sırasında hipoksantin ksanine dönüşümü de artmaktadır ve oksidatif stres artmaktadır. Hasarlanan dokuda hücre içi kalsiyum düzeyinin artması vasküler fonksiyonları olumsuz etkilemektedir. I/R hasarı oluşturulan grupta GFR belirgin şekilde düşmektedir(Devarajan, 2006). Tübüler hücrelerde polarizasyon I/R hasar derecesine göre bozulmaya başlamaktadır, hücreler arasındaki adezyon ortadan kalkarak hücreler dökülmektedir. Özellikle hücre yüzeyinde bulunan Na-K-ATP az enzim fonksiyonları ilk etkilenen bölgelerdir ve bu nedenle I/R hasarında tübüler Na ve K atılımı da bozulmaktadır (Kwon ve ark., 1998). Çalışmamızda I/R grubunda hem glomerüler fonksiyonların hem de tübüler fonksiyonların bozulduğu görülmüştür. EPO uygulaması ve önşartlanma; tübüler hasarı düzelterek Na ve K atılımını normal değerlere yaklaştırmıştır. Beraberlerinde glibenklamid uygulamasının ise her iki gruptaki olumlu etkiyi inhibe ettiği gözlenmiştir. Tek başına glibenklamid uygulaması sham ve I/R gruplarında glomerüler ve tübüler fonksiyonlarda anlamlı değişim yapmamıştır. EPO' nun ve HIF-1 α 'nın, iskemi sırasında, tübüler enerji ihtiyacını düzenleyerek dengede tuttuğu bilinmektedir. Bu etkiye Na-K-ATP az enzim aktivitesinin düzenlenmesi de katılmaktadır (Coux ve ark., 2001). EPO doğrudan veya HIF-1 α 'nın ekspresyonunu arttırarak tübüler fonksiyonları düzenliyor olabilir. EPO' nun glomerüler ve tübüler fonksiyonları düzenleyici etkisinde bu hücrelerde antiapoptotik etki göstererek doku hasarını engellemiş olması olasıdır. Tübüler hücrelerin korunması renal K⁺ ve H⁺ dengelerini de düzenleyecektir.

Sonuç olarak, renal I/R hasarı inflamatuvar sürecin aktivasyonu, apoptosinin artmasıyla seyreden ve böbrek fonksiyonlarının da durumdan ciddi boyutta etkilendiği bir patolojik olaydır. Önşartlanma ve EPO tedavisi renal I/R hasarını anti-inflamatuvar, antiapoptotik etki göstererek azaltmaktadır. Bu etkide K-ATP kanalları rol oynamaktadır. İnflamasyon ve mitojenik olaylarda yer aldığı görülen midkinin; EPO ve önşartlanmaya bağlı koruyucu etkide yer aldığı dikkat çekmektedir. Renal I/R hasarında EPO' nun koruyucu etkisinde K-ATP kanallarının ve midkin yapımının

katılımı yeni bir bulgudur. I/R hasarı oluş mekanizmasında, K kanalları ile midkinin rolü konularında olaya katılan olası reseptörlerin ve hücre içi sinyal iletim yollarındaki değişimlerin ileri çalışmalarla açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu çalışmanın, ileride yapılacak çalışmalara katkıda bulunabilecek bir rehber çalışma olması umudu taşınmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışma kapsamında sıçanlarda deneysel iki taraflı renal IR modeli oluşturulmuştur. EPO nun I/R hasarındaki etkisi belirlenmiş ve bu etkinin K-ATP kanal inhibitörü glibenklamid ile inhibe edilip edilemediği araştırılmıştır. Çalışma; 200-250 gr ağırlığında her iki cinse ait 100 adet Spraque-Dawley türü sıçan ile 10 grupta (n=10/grup) gerçekleştirilmiştir.

Grup I: Sham opere, saline enjekte ip,
Grup II: Sham opere+ 500 IU/kg EPO,
Grup III: Sham opere+glibenklamid (K-ATP kanal blokörü-40 mM/kg),
Grup IV: Sham opere+EPO+glibenklamid,
Grup V: Kontrol. I/R yapılmış salin enjekte,
Grup VI: I/R +500 IU/kg EPO,
Grup VII: I/R+önşartlanma,
Grup VIII: I/R+ glibenklamid,
Grup IX: IR+EPO+glibenklamid,
Grup X: IR+önşartlanma+glibenklamid.
2. EPO ve/veya glibenklamid uygulanan sham gruplarında histopatolojik olarak bir fark görülmemiştir. I/R yapılan grupta böbrek dokusunda belirgin hasarlanma gözlenmiştir. EPO tedavisi ve önşartlanma uygulaması I/R hasarını histopatolojik olarak düzeltmiştir. K-ATP kanal blokajı; EPO ve önşartlanma uygulamasının koruyucu etkilerini inhibe etmiştir. I/R grubunda sadece glibenklamid uygulaması I/R hasarını kısmen düzeltmiştir.
3. Doku apoptosis göstergesi kaspaz-3 düzeyleri; EPO ve/veya glibenklamid uygulanan sham gruplarıyla sham grubu arasında fark göstermemiştir. I/R hasarı dokuda kaspaz-3 düzeyini belirgin bir şekilde arttırmıştır. EPO tedavisi

ve önşartlanma uygulaması I/R hasarına bağlı apoptosisi azaltmış, K-ATP kanal blokajı; EPO ve önşartlanma uygulamasının anti-apoptotik etkisini inhibe etmiştir. I/R grubunda sadece glibenklamid uygulaması I/R hasarına bağlı apoptosisi kısmen düzeltmiştir.

4. Doku pro-inflamatuvar sitokin düzeyleri; EPO ve/veya glibenklamid uygulanan sham gruplarıyla sham grubu arasında fark göstermemiştir. I/R hasarı dokuda TNF- α ve IL-6 düzeylerini belirgin bir şekilde arttırmıştır. EPO tedavisi ve önşartlanma uygulaması I/R hasarına bağlı proinflamatuvar sitokin yapımını azaltmış, K-ATP kanal blokajı; EPO ve önşartlanma uygulamasının anti-inflamatuvar etkisini inhibe etmiştir. I/R grubunda sadece glibenklamid uygulaması I/R hasarına bağlı inflamasyonu kısmen düzeltmiştir.
5. Doku nitrit düzeyleri; sadece EPO verilen grupta artmış bulunmasında rağmen glibenklamid uygulanan sham gruplarıyla sham grubu arasında fark göstermemiştir. I/R hasarı dokuda nitrit düzeyini belirgin bir şekilde arttırmıştır. EPO tedavisi ve önşartlanma uygulaması doku nitrit düzeyini I/R grubu kadar olmasa da arttırmıştır. K-ATP kanal blokajı; hem I/R grubundaki hem de I/R sırasında EPO ve önşartlanma uygulamasına bağlı nitrit yapımını inhibe etmiştir.
6. Doku HIF-1 α mRNA ekspresyonu; EPO ve/veya glibenklamid uygulanan sham gruplarıyla sham grubu arasında fark göstermemiştir. I/R hasarı dokuda HIF-1 α mRNA ekspresyonu belirgin bir şekilde azaltmıştır. EPO tedavisi ve önşartlanma uygulaması I/R hasarı sonrası HIF-1 α mRNA ekspresyonunu arttırmıştır. K-ATP kanal blokajı; HIF-1 α mRNA ekspresyonunu inhibe etmiştir.
7. Kontrol grubunda EPO ve/veya glibenklamid uygulaması hayvanlarda SP, HR düzeylerini değiştirmemiştir. I/R sırasında hayvanlarda SP belirgin şekilde artmış, HR hızlanmıştır. I/R öncesi EPO tedavisi ve önşartlanma

uygulaması SP ve HR düzeyini kontrol değerlerine yaklaştırmıştır. K-ATP kanal blokajı uygulanan I/R grubunda SP ve HR yüksek devam etmiştir. Glibenklamid uygulaması I/R sırasında EPO ve önşartlanma uygulamasına bağlı SP ve HR' deki azalmayı engellemiştir.

8. Kan glukoz düzeyi EPO verilen gruplarda değişmezken, glibenklamid uygulanan sham grubunda azalmıştır. I/R hasarı sonrası serum glukoz düzeyi belirgin şekilde artmış bulunmuştur. I/R sırasında EPO ve/veya glibenklamid uygulaması serum glukoz düzeylerini düşürmüştür.
9. Sham grubunda glibenklamid uygulaması glomerüler fonksiyonlarda değişiklik yapmazken, EPO uygulaması GFR değerini arttırmıştır. I/R hasarı sonrasında böbrek glomerüler fonksiyonları belirgin şekilde bozulmuştur. I/R hasarı uygulanan hayvanların serum üre, kreatinin düzeyleri sham grubuna göre anlamlı artmış, GFR değerleri düşük bulunmuştur. EPO tedavisi ve önşartlanma uygulaması böbrek fonksiyonlarını sham grubuna yaklaştırmak için K-ATP kanal blokajı; I/R öncesinde EPO ve önşartlanma uygulamasına bağlı GFR artışını inhibe etmiştir. I/R öncesinde glibenklamid uygulanan grupta serum üre, kreatinin düzeyleri de yüksek bulunmuştur.
10. Sham grubunda EPO ve/veya glibenklamid uygulaması tübüler fonksiyon göstergesi olan fraksiyone Na ve K atılımlarında değişiklik yapmamıştır. I/R hasarı sonrasında böbrek tübüler fonksiyonları belirgin şekilde bozulmuştur. I/R hasarı uygulanan hayvanların fraksiyone Na ve K atılımlarında belirgin artış gözlenmiştir. I/R öncesi EPO tedavisi ve önşartlanma uygulaması böbrek tübüler fonksiyonlarını sham grubuna yaklaştırmak için K-ATP kanal blokajı; I/R öncesinde EPO ve önşartlanma uygulamasına bağlı fraksiyone Na ve K atılımlarında artışın devam etmesine neden olmuştur. I/R öncesinde glibenklamid uygulanan grupta fraksiyone Na ve K atılım düzeyleri de yüksek bulunmuştur.

11. Doku hasarı ve apoptosis düzeyleri hem sham grubunda hem de I/R gruplarında doku pro-inflamatuvar sitokin TNF- α düzeyleri ile pozitif korele bulunmuştur.
12. Kontrol gruplarında doku nitrit düzeyindeki artış GFR düzeyleriyle pozitif korele bulunmuştur. Aynı korelasyon I/R gruplarında bulunamamıştır.
13. Doku midkin düzeyleri I/R grubunda doku TNF- α düzeyleri ile pozitif korele bulunmuştur.
14. Doku midkin düzeyleri ile doku kazpaz-3 düzeyleri I/R grubunda pozitif korele iken sham gruplarında korelasyon bulunamamıştır.

ÖZET

Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Eritropoietinin Koruyucu Etkisine K-ATP Kanallarının Katılımı

Eritropoietin (EPO) hipoksiye cevap olarak yapılan ve salınan sitoprotektif bir sitokindir. EPO reseptörleri böbrek de dahil olmakla beraber pek çok dokuda bulunur. EPO'nun koruyucu etkisi farklı iskemi reperfüzyon (I/R) hücre ve doku modelleriyle gösterilmiştir. Midkin son dönemlerde I/R hasarı oluşum mekanizmasında yer aldığı düşünülen anti-apoptotik ve mitojenik etkili eski bir moleküldür. Bu çalışmada *in vivo* sıçan renal I/R modelinde EPO'nun etkisi, bu etkide ve EPO'nun anti-apoptotik etkisinde rol alması olası mekanizmaların araştırılması hedeflenmiştir.

Erkek Spraque-Dawley sıçanlar 45 dk renal iskemiye maruz bırakıldıktan sonra 4 saatlik reperfüzyon sonrası deney sonlandırılmıştır. Deney gruplarına uygun olarak I/R hasarından 30 dk önce 5 dk iskemi, EPO (500 U/kg, i.p.) ve/veya glibenklamid (40 mM/kg) uygulanmıştır Sham opere grup kontrol olarak kabul edilmiştir. Deney sonunda; renal disfonksiyon ve doku hasarlanması histolojik doku hasarı derecelendirmesi, serum biyokimyasal göstergeleri (üre, kreatinin, K ve Na düzeyleri) ile değerlendirilmiştir. Apoptosis doku kaspaz-3 düzeyleri ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada iskemi öncesi tek doz sistemik EPO uygulanmasının sıçanlarda renal I/R hasarından koruyucu olduğu bulunmuştur. Özellikle EPO ve önşartlanma glomerüler disfonksiyonu, tübüler hasarı (biyokimyasal ve histolojik değerlendirmeler ile) belirgin şekilde düzeltmektedir. EPO, *in vivo* kaspaz-3 aktivasyonunu da engelleyerek anti-apoptotik etki göstermektedir. EPO; I/R sonrası inflamatuvar cevabı; proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-6 yapımını azaltarak göstermektedir. EPO ve önşartlanmanın anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkilerinde ATP bağımlı K kanal aktivasyonunun katıldığı görülmüştür. EPO tedavisi ve önşartlanma renal dokuda HIF-1 α mRNA ekspresyonunu da arttırmaktadır. ATP bağımlı K kanal blokajı HIF-1 α mRNA ekspresyonunu inhibe etmektedir. Midkin sekresyonu renal I/R hasarını takiben artmaktadır. EPO ön tedavisi doku midkin düzeyinde daha fazla artışa neden olmakta ve bu artış glibenklamid ile inhibe olmaktadır.

Sonuç olarak; EPO renal I/R hasarı sırasında anti-apoptotik, anti-inflamatuvar etki göstererek koruyucu etki göstermektedir. EPO'nun koruyucu etkisi önşartlanma benzeri bir etki olup ATP bağımlı K kanal blokajı ile inhibe olmaktadır. HIF-1 α mRNA ekspresyonu ve midkin sekresyonu da bu koruyucu etki de yer alıyor gibi görünmektedir. Midkin ve EPO'nun renal I/R hasarındaki etkilerinin belirlenmesi ve aradaki bağlantının bulunabilmesi için daha fazla çalışmaya gerek vardır.

Anahtar Sözcükler: Renal iskemi reperfüzyon hasarı, eritropoietin, midkin, ATP bağımlı K kanalları, HIF-1, TNF, IL-6, nitrit, apoptosis, kaspaz-3, glomerüler filtrasyon hızı (GFR), tübüler fonksiyon .

SUMMARY

Involvement of ATP Dependent K Channels To Protective Role Of Eritropoietin During Renal Ischemia Reperfusion Injury

Erythropoietin (EPO) is upregulated by hypoxia. EPO receptors are expressed in many tissues, including the kidney. Protective effects of EPO have been demonstrated in various tissues and experimental models of ischaemia-induced injury. Midkine is an old molecule but recently it starts to take part in ischemia induced injury mechanisms. It has anti-apoptotic and mitogenic effects. In the present study, we investigated the effect of EPO on an *in vivo* rat model of renal ischaemia/reperfusion (I/R) injury and the possible mechanisms implicated in the EPO-mediated anti-apoptotic action.

Male Sprague-Dawley, subjected to renal ischaemia for 45 min, were administered either saline or EPO (500 U/kg, *i.p.*) and/or glibenclamide (40 mM/kg) 30 min prior to I/R. Short term (5 min) ischemia and/or glibenclamide applied 30 min prior to I/R group to evaluate the role of preconditioning during I/R injury. A sham-operated group served as the control. At the end of 4 h of reperfusion, the renal dysfunction and injury was assessed by measurement of serum biochemical markers (urea, creatinine, Na, K) and histological grading. Apoptosis was assessed by the tissue caspase-3 levels and morphological criteria.

Here it is shown that a single systemic administration of EPO preischemia I/R injury in the rat kidney. Specifically, EPO and preconditioning reduced glomerular dysfunction and tubular injury (biochemical and histologic assessment) and prevented caspase-3 activation *in vivo* and reduced apoptotic cell death. EPO attenuated inflammatory response to I/R injury in rats by decreasing TNF- α and IL-6 production. The anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of EPO and preconditioning were dependent on ATP dependent K channel activation during renal I/R injuries of the rats. EPO treatment and preconditioning increased HIF-1 α mRNA expression during renal I/R injury and ATP dependent K channel blockage inhibits HIF-1 α mRNA expression. Midkine secretion was induced by renal I/R damage, EPO pretreatment caused further increase in tissue midkine levels of I/R group. ATP dependent K channel blockage inhibits midkine secretion.

As a conclusion; EPO is an anti-apoptotic, anti-inflammatory molecule during renal I/R damage of rats. ATP dependent K channel activation, HIF-1 α mRNA expression and midkine takes part in its cytoprotective effects. Further studies are needed to evaluate role and mechanisms of midkine during I/R injury and its relationship with EPO.

Key words: Renal ischemia reperfusion injury, erythropoietin (EPO), midkine, ATP dependent K channels, HIF-1, TNF, IL-6, nitrite, apoptosis, caspase-3, glomerular filtration rate (GFR), tubular function .

KAYNAKLAR:

- ATES, E., YALCIN, A.U., YILMAZ, S., KOKEN, T., TOKYOL, C. (2005). Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. *ANZ J Surg.* **75(12)**:1100-5.
- AUST, A.E., EVELEIGH, J.F. (1999). Mechanisms of DNA oxidation. *PSEBM*; **222**: 246-252.
- BAGNIS, C., BEAUFILS, H., JACQUIAUD, C., ADABRA, Y., JOUANNEAU, C., LE NAHOUR, G., JAUDON, M.C., BOURBOUZE, R., JACOBS, C., DERAY, G. (2001). Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrol Dial Transplant.* **16(5)**:932-8
- BAINES, C.P., COHEN, M.V., DOWNEY, J.M. (1999) Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**, 741-754
- BAKER, J.E. (2005). Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. *Vascul Pharmacol.* **42(5-6)**:233-41.
- BLANTZ, R.C., DENG, A., LORTIE, M., MUNGER, K., VALLON, V., GABBAI, F.B., THOMSON, S.C. (2002). The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int.* **61**:782-785.
- BOUCHARD, R., CLARK, R.B., JUHASZ, A.E., GILES, W.R. (2004). Changes in extracellular K⁺ concentration modulate contractility of rat and rabbit cardiac myocytes via the inward rectifier K⁺ current IK1. *J Physiol.* **556**:773-90.
- BRINES, M., CERAMI, A. (2006). Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int.* **70(2)**:246-50.

CHOUDHURI R., ZHANG, H. T., DONNINI, S., ZICHE, M. AND BICKNELL, R. (1997) An angiogenic role for the neurokinins midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res.* **57**, 1814-1819.

COUX, G., TRUMPER, L., ELIAS, M.M. (2001) Cortical Na⁺,K⁺-ATPase activity, abundance and distribution after in vivo renal ischemia without reperfusion in rats. *Nephron.* **89(1)**:82-9.

CZYŻ, A., SZEWCZYK, A., NAŁĘCZ, M.J., WOJTCZAK, L. (1995) The role of mitochondrial potassium fluxes in controlling the protonmotive force in energized mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**: 98-104.

DEL CASTILLO, D., RAIJ, L., SHULTZ, P.J., TOLINS, J.P. (1995). The pressor effect of recombinant human erythropoietin is not due to decreased activity of the endogenous nitric oxide system. *Nephrol Dial Transplant*, **10 (4)**:505-508.

DEVARAJAN, P. (2006). Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.*; **17(6)**:1503-20.

DIGICAYLIOGLU, M., LIPTON, S.A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kB signalling cascades. *Nature* **412**: 641–647.

DONNAHOO, K.K., SHAMES, B.D., HARKEN, A.H., MELDRUM, D.R. (1999). Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol. Jul*; **162(1)**:196-203.

DONNELLY, S. (2001). Why is erythropoietin made in kidney? The kidney functions as a critmeter. *Am J Kidney Dis*, **38(2)**:415-425.

DONNELLY, S. (2003). Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a 'critmeter' to regulate the hematocrit. *Adv Exp Med Biol.* **543**:73-87.

DOWNEY, J.M., DAVIS, A.M., COHEN, M.V. (2007). Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev.* May 22

DROGE, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82(1)**:47-95.

EBERT, B.L., BUNN, H.F. (1999). Regulation of erythropoietin gene. *Blood*, **94(6)**:1864-1877.

FACUNDO, H.T., DE PAULA, J.G., KOWALTOWSKI, A.J. (2007). Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med.* **1;42(7)**:1039-48.

FATON, H., PÌCHIULE, P., CHAVEZ, J.C., LAMANNA, J.C. (2000). The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem*, **275 (46) 17**: 35863-35867.

FISHER, J.W., NAKASHIMA, J. (1992). The role of hypoxia in renal production of erythropoietin. *Cancer*, **70**:928-939.

FLISER, D., BAHLMANN, F.H., DEGROOT, K., HALLER, H. (2006). Mechanisms of disease: erythropoietin--an old hormone with a new mission? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **3(10)**:563-72

FURUICHI, K., WADA, T., YOKOYAMA, H., KOBAYASHI, K.I. (2002). Role of Cytokines and Chemokines in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Drug News Perspect.* **15(8)**:477-482.

GHEZZI, P., BRINES, M. (2004). Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ.* **11 Suppl 1**:S37-44.

HAASE, V.H. (2006). Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.*; **291(2)**:F271-81.

HAI, S., TAKEMURA, S., MINAMIYAMA, Y., YAMASAKI, K., YAMAMOTO, S., KODAI, S., TANAKA, S., HIROHASHI, K., SUEHIRO, S. (2005) Mitochondrial K(ATP) channel opener prevents ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Transplant Proc*; **37(1)**:428-31.

HALESTRAP, A.P. (1994) Regulation of mitochondrial metabolism through changes in matrix volume. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 522-529.

HAN, J., KIM, N. JOO, H., KIM, E. (2002). Ketamine abolishes ischemic preconditioning through inhibition of K_{ATP} channels in rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**: H13-H21.

HANLEY, P.J., DAUT, J. (2005). K(ATP) channels and preconditioning: re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.*; **39(1)**:17-50.

HEBERT, S.C., DESIR, G., GIEBISCH, G., WANG, W. (2005). Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev.*; **85(1)**:319-71

HERRERA, M., ORTIZ, P.A., GARVIN, J.L. (2006). Regulation of thick ascending limb transport: role of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol.*; **290(6)**:F1279-84.

HIR, M.L., ECKARDT, K.U., KAISLING, B., KOURY, S.T., KURTZ, A. (1991). Structure-function correlations in erythropoietin formation and oxygen sensing in the kidney. *Klin Wochenschr*, **69**:567-575.

HORIBA, M., KADOMATSU, K., NAKAMURA, E., MURAMATSU, H., IKEMATSU, S., SAKUMA, S., HAYASHI, K., YUZAWA, Y., MATSUO, S., KUZUYA, M., KANAME, T., HIRAI, M., SAITO, H. AND MURAMATSU, T.

(2000) Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 489-495

HORIBA M, KADOMATSU K, YASUI K, LEE JK, TAKENAKA H, SUMIDA A, KAMIYA K, CHEN S, SAKUMA S, MURAMATSU T, KODAMA I. (2006). Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction. *Circulation.* **17;114(16)**:1713-20.

<http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/pathway/epo.html>, 01.06.2007

IMAMURA, R., ISAKA, Y., ICHIMARU, N., TAKAHARA, S., OKUYAMA, A. (2007). Carbamylated erythropoietin protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury without stimulating erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **16;353(3)**:786-92.

IMAMURA, R., MORIYAMA, T., ISAKA, Y., NAMBA, Y., ICHIMARU, N., TAKAHARA, S., OKUYAMA, A. (2007). Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1 alpha. *Transplantation.* **27;83(10)**:1371-9.

IWAI, T., TANONAKA, K., KOSHIMIZU, M., TAKEO, S. (2000) Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischaemia in the rat heart. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 1219-1227.

JENKINSON, D.H. (2006). Potassium channels multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol.* **147 Suppl 1**:S63-71.

JONAS, E. (2004). Regulation of synaptic transmission by mitochondrial ion channels. *J Bioenerg Biomembr.*; **36(4)**:357-61.

JONES, M., SCHENKEL, B., JUST, J. (2005). Epoetin alfa's effect on left ventricular hypertrophy and subsequent mortality. *Int J Cardiol.*; **100(2)**:253-65.

JOYEUX-FAURE, M., RAMOND, A., BEGUIN, P.C., BELAIDI, E., GODIN-RIBUOT, D., RIBUOT, C. (2006). Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. *Fundam Clin Pharmacol.* **20(1)**:51-6.

JUUL, S.E. (2000). Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate. *Clin Perinatol.* **27(3)**:527-41.

KAPLAN, F., COMBER, J., SLADEK, R., HUDSON, T.J., MUGLIA, L.J., MACRAE, T., GAGNON, S., ASADA, M., BREWER, J.A., SWEEZEY, N.B. (2003). The growth factor midkine is modulated by both glucocorticoid and retinoid in fetal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **28(1)**:33-41.

KHADAROO, R.G., PARODO, J., POWERS, K.A., PAPIA, G., MARSHALL, J.C., KAPUS A, ROTSTEIN, O.D. (2003). Oxidant-induced priming of the macrophage involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase through an Src-dependent pathway. *Surgery.*; **134(2)**:242-6.

KLINGMÜLLER, U. (1997). The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells. *Eur J Biochem,* **249**:637-47.

KURTZ A, SCHULTE AM, WELLSTEIN A. (1995). Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology. *Crit Rev Oncog.* **6(2)**:151-77.

KWON, O., NELSON, W.J., SIBLEY, R., HUIE, P., SCANDLING, J.D., DAFOE, D., ALFREY, E., MYERS, B.D. (1998). Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *J Clin Invest.* **15;101(10)**:2054-64.

LAYCOCK, S.K., VOGEL, T., FORFIA, P.R., TUZMAN, J., XIAOBIN, X., OCHOA, M., THOMPSON, C.I., NASJLETTI, A., HINTZE, T.H. (1998). Role of

nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney. *Circ Res*, **82**: 1263-71.

LEE, J.W., BAE, S.H., JEONG, J.W., KIM, S.H., KIM, K.W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. **29**;**36**(1):1-12.

LI, C., JACKSON, R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C227–C241

LIEN, Y.H., LAI, L.W., SILVA, A.L. (2003). Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sci*. **19**;**74**(5):543-52.

LISA M. WALKER, L.M., YORK, L.L., IMAM, S.Z., ALI, S.F., MULDREW, K.L., MAYEUX, P.R. (2001). Oxidative Stress and Reactive Nitrogen Species Generation during Renal Ischemia. *Toxicological Sciences* **63**, 143–8.

LIU, X., XIE, W., LIU, P., DUAN, M., JIA, Z., LI, W., XU, J. (2006). Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci*. **4**;**78**(19):2255-64.

LOPEZ-NEBLINA, F. TOLEDO, A.H., TOLEDO-PEREYRA, L.H. (2005). Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*; **18**(6):335-50.

MACKINNON, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Lett*. **27**;**555**(1):62-5.

MATSUURA, O., KADOMATSU, K., TAKEI, Y., UCHIMURA, K., MIMURA, S., WATANABE, K., MURAMATSU, T. (2002). Midkine expression is associated with postnatal development of the lungs. *Cell Struct Funct*. **27**(2):109-15.

MCMICHAEL, M., MOORE R.M. (2004). Ischemia reperfusion injury pathophysiology, part I. *J Vet Emerg Crit Care* **14(4)** , 231-241

MEREDITH, G., BARBARA, S.B. (1991). Signal transduction in erythropoiesis. *FASEB J*, **5**: 2958-2964.

MITSIADIS, T.A., SALMIVIRTA, M., MURAMATSU, T., MURAMATSU, H., RAUVALA, H., LEHTONEN, E., JALKANEN, M. AND THESLEFF, I. (1995) Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis, *Development* **121**, 37-51.

MIURA, T., TSUCHIDA, A. (1999) Adenosine and preconditioning revisited. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26**, 92-99.

MURAMATSU T. (2002). Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem (Tokyo)*. **132(3)**:359-71.

NOWICKI, M., KOKOT, F., WIECEK, A. (1993). Renin-angiotensin system stimulation on erythropoietin production in patients with various forms of arterial hypertension. *Nephron*, **65**:527-532.

OCKAILI, R., EMANI, V.R., OKUBO, S., BROWN, M., KROTTAPALLI, K., KUKREJA, R.C. (1999) Opening of mitochondrial K_{ATP} channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **277**, H2425-H2434.

OWADA, K., SANJO, N., KOBAYASHI, T., MIZUSAWA, H., MURAMATSU, H., MURAMATSU, T. AND MICHIKAWA, M. (1999) Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J. Neurochem.* **73**, 2084-92.

PALLER, M.S., HOIDAL, J.R., FERRIS, T.F. (1984). Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest*, **74(4)**:1156-64.

PANZACCHI, G., PIERUZZI, F., CASTOLDI, G., BUSCA, G., BATTISTA, G., BUCCIANTI, G., RADICE, F., FAVA, C., MARTINI, I., ZANCHETTI, A., GOLIN, R., STELLA, A. (1997). Effects of erythropoietin administration on blood pressure and urinary albumin excretion in rats. *Am J Hypertens*, **10**:772-78.

PATEL, A.J., HONORE, E. (2001). Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur Respir J*. **18(1)**:221-227.

POMPERMAYER, K., SOUZA, D.G., LARA, G.G., SILVEIRA, K.D., CASSALI, G.D., ANDRADE, A.A., BONJARDIM, C.A., PASSAGLIO, K.T., ASSREUY, J., CUNHA, F.Q., VIEIRA, M.A., TEIXEIRA, M.M. (2005). The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int*. **67(5)**:1785-96.

POWELL JD, ELSHTEIN R, FOREST DJ, PALLADINO MA. (2002). Stimulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) protein in the adult rat testis following ischemic injury occurs without an increase in HIF-1alpha messenger RNA expression. *Biol Reprod*. **67(3)**:995-1002.

RAFIEE, P., SHI, Y., SU, J., PRITCHARD, K.A., TWEDDELL, J.S., BAKER, J.E. (2005). Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol*.; **100(3)**:187-97.

RATCLIFFE, P.J., O'ROURKE, J.F., MAXWELL, P.H., PUGH, C.W. (1998). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol*. **201(Pt 8)**:1153-62.

RUNDBACK, J.H., MURPHY, T.P., COOPER, C., WEINTRAUB, C.H. (2002). Chronic renal ischemia: pathophysiologic mechanisms of cardiovascular and renal disease. *J Vasc Interv Radiol.* **13(11)**:1085-92.

SAKANAKA, M., WEN, T.C., MATSUDA, S., MASUDA, S., MORISHITA, E., NAGAO, M., SASAKI, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci* **14;95(8)**:4635-40.

SANDAU, K.B., ZHOU, J., KIETZMANN, T., BRUNE, B. (2001). Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem.* **26;276(43)**:39805-11.

SASAKI, N., SATO, T., OHLER, A., O'ROURKE, B. & MARBAN, E. (2000) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* **101**, 439-445.

SATO, T., O'ROURKE, B., MARBAN, E. (1998) Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ. Res.* **83**,110-114.

SATO, W., KADOMATSU, K., YUZAWA, Y., MURAMATSU, H., HOTTA, N., MATSUO, S., MURAMATSU, T. (2001). Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J Immunol.* **15;167(6)**:3463-9.

SATO, W., YUZAWA, Y., KADOMATSU, K., TAYASU, T., MURAMATSU, H., MURAMATSU, T., MATSUO, S. (2002). Midkine expression in the course of nephrogenesis and its role in ischaemic reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* **7 Suppl 9**:52-4.

SCHRIER R.W. Atlas of Kidney Diseases (Online Edition, 2007), Section II, Chapter 16. <http://www.kidneyatlas.org/toc.htm>

SEMENZA, G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* **64(5-6)**:993-8.

SEMENZA, G.L.(2004). Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).*; **19**:176-82.

SEMENZA, G.L., SHIMODA, L.A., PRABHAKAR, N.R. (2006). Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp.* **272:2-8**; discussion 8-14, 33-6.

SHADDY, R.E., BULLOCK, E.A., TANI, L.Y., ORSMOND, G.S., HUNTER, D.D., CHRISTENSEN, R.D. (1995). Epoetin alfa therapy in infants awaiting heart transplantation. *Arch Pediatr Adolesc Med.* **149(3)**:322-5.

SHARPLES, E.J., PATEL, N., BROWN, P., STEWART, K., MOTA-PHILIPPE, H., SHEAFF, M., KIESWICH, J., ALLEN, D., HARWOOD, S., RAFTERY, M., THIEMERMANN, C., YAQOOB, M.M. (2004). Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* **15(8)**:2115-24.

SHARPLES, E.J., YAQOOB, M.M. (2006). Erythropoietin and acute renal failure. *Semin Nephrol.* **26(4)**:325-31.

SHI, Y., RAFIEE, P., SU, J., PRITCHARD, K.A., TWEDDELL, J.S., BAKER, J.E. (2004). Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res Cardiol.*; **99(3)**:173-82.

SPANDOU, E., TSOUCHNIKAS, I., KARKAVELAS, G., DOUNOUSI, E., SIMEONIDOU, C., GUIBA-TZIAMPIRI, O., TSAKIRIS, D. (2006). Erythropoietin attenuates renal injury in experimental acute renal failure ischaemic/reperfusion model. *Nephrol Dial Transplant.* **21(2)**:330-6.

SPIVAK JL, HOGANS BB. (1989). The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood*, **73 (1)**: 90-9.

SPIVAK, J.L. (1998). Erythropoietin: biology and clinical applications. *Semin Oncol*, **25 (3)**:7-11.

STOCKMANN, C., FANDREY, J. (2006). Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; **33(10)**:968-79.

STURIALE, A., CAMPO, S., CRASCI, E., ALOISI, C., BUEMI, M. (2007). Experimental models of acute renal failure and erythropoietin: what evidence of a direct effect? *Ren Fail.***29(3)**:379-86.

SZEWczyk, A. (1998) The intracellular potassium and chloride channels: properties, pharmacology and function. *Molec. Membr. Biol.* **15**: 49-58.

TANG, X.D., SANTARELLI, L.C., HEINEMANN, S.H., HOSHI, T. (2004). Metabolic regulation of potassium channels. *Annu Rev Physiol.* **66**:131-59.

TEXTOR, S.C. (2004). Ischemic nephropathy: where are we now? *J Am Soc Nephrol*, **15(8)**:1974-82.

TOJO, A., DOUMOTO, M., OKA, K., NUMABE, A., KIMURA, K., YAGI, S. (1996). Endothelin mediated effect of erythropoietin on blood pressure and renal hemodynamics in hypertensive rats. *Am J Physiol*, **270**: R744-48.

TUNCTAN, B., ABACIOĞLU, A. (1998). Biyolojik yöntemlerle nitrik oksit ölçümü. *Fabad J Pharm Sci*, **23**:161-170.

UZUNER, K., YAZIHAN, N., AYDIN, Y., UYAR, R., BAGLA, S. (2004). Acute erythropoietin infusion increases rat glomerular filtration rate partly stimulating intrarenal nitric oxide production. *J Health Sci.*: **50 (4)**:343-347

VAZIRI, N.D., ZHOU, X.J., SMITH, J., OVEISI, F., BALDWIN, K., PURDY, R.E. (1995). In vivo and in vitro pressor effects of erythropoietin in rats. *Am J Physiol*, **269**: F838-45.

VESEY, D.A., CHEUNG, C., PAT, B., ENDRE, Z., GOBE, G., JOHNSON, D.W. (2004). Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant*. **19(2)**:348-55.

WADA M, KAMATA M, AIZU Y, MORITA T, HU J, OYANAGI K. (2002). Alteration of midkine expression in the ischemic brain of humans. *J Neurol Sci*. **15;200(1-2)**:67-73.

WANG, Y., HIRAI, K., ASHRAF, M. (1999) Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ. Res.* **85**, 731-741

WENGER, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*. **16(10)**:1151-62.

WINEARLS, C.G.(1998). Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience. *Nephrol Dial Transplant*, **13**:3-8.

YANG, B., JAIN, S., PAWLUCZYK, I.Z., IMTIAZ, S., BOWLEY, L., ASHRA, S.Y., NICHOLSON, M.L. (2005). Inflammation and caspase activation in long-term renal ischemia/reperfusion injury and immunosuppression in rats. *Kidney Int.*; **68(5)**:2050-67.

YANG, C.W., LI, C., JUNG, J.Y., SHIN, S.J., CHOI, B.S., LIM, S.W., SUN, B.K., KIM, Y.S., KIM, J., CHANG, Y.S., BANG, B.K. (2003). Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J.* **17(12)**:1754-5.

YAZIHAN, N., ATAÖĞLU, H., YENER, B., AYDIN, C. (2007). Hepatositlerde Oluşturulan Hidrojen Peroksit Toksitesinde Eritropoietin'nin Koruyucu Rolü, 6. Ulusal Hepatoloji Kongresi, *Hepatology Forum*, **1 (1)**: 66

Özgeçmiş:**I- Bireysel Bilgiler****Adı:** Nuray**Soyadı:** Yazıhan**Doğum yeri ve tarihi:** Çankırı, 11.061969**Uyruğu:** T.C.**Medeni durumu:** Boşanmış, 1 çocuklu.**İletişim adresi ve telefonu:**

Gezegen Sok. 9/6

Gaziosmanpaşa /ANKARA

0 505 4568343

II- Eğitimi

2003- Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
İç Hastalıkları AbD, Fizyopatoloji BD,
Ankara (Uzmanlık)

2000-2004 Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Fizyoloji AbD, Eskişehir (Uzmanlık)

1986-1994 Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi (İng)
Ankara, Tıp Doktoru

Yabancı dili: İngilizce (UDS: 91,25 Aralık-2006)**III. Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)**

1994-2000	Pratisyen Hekim (Dializ Sorumlu Hekimi)
2000-2004	Araştırma Görevlisi
2004-	Uzman Hekim

IV- Mesleki Deneyimi:

- 1994-2000 Çankırı Devlet Hastanesi, Hemodializ Ünitesinde sorumlu hekim
 2000-2004 Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD-Araştırma Görevlisi
 2004- Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyopatoloji BD ve Moleküler
 Biyoloji Araştırma ve Geliştirme Birimi-Uzman hekim

V- Üye Oldugu Bilimsel Kuruluşlar

1. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği ,2000-
2. The Physiology Society-UK, 2002-
3. International Society of Heart Research, 2003-
4. American Physiological Society, 2005

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları: (ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap ya da kitap bölümü vb.)

1. Uzmanlık Tezi : Eritropoietin infüzyonunun sıçan kardiyorenal fonksiyonları üzerine etkisi: Nitrik oksit ve glutamatın rolü. Osmangazi Üniversitesi, TıpFakültesi, Fizyoloji ABD, 2004- Eskişehir
2. Erkasap N, Kahraman A, Koken T, **Yazihan N**, Ates E, Uzuner K. The Effect of Quercetin Pretreatment on Renal Tissue and Serum Nitrite Levels During Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. Türk Cerrahi Arşivi, 2000: 5 (4): 150-154
3. Uzuner K, **Yazihan N** Aydın Y, Uyar R, Bagla S. Acute erythropoietin infusion increases rat glomerular filtration rate partly stimulating intrarenal nitric oxide production. J Health Sci., 2004: 50 (4):343-347

4. Erkasap S, Erkasap N, Koken T, Kahraman A, Uzuner K, **Yazihan N**, Ates E. Effect of Leptin on renal ischemia-reperfusion damage in rats. *J Physiol and Biochem*, 2004: 60 (2): 79-84
5. Kaygisiz Z, Erkasap N, **Yazihan N**, Sayar K, Ataoglu H, Uyar R, İkizler M. Erythropoietin changes contractility, cAMP, and nitrite levels of isolated rat hearts. *J Physiol Sci*. 2006: 56(3):247-51.

Uluslararası bildiriler:

1. Kocer B, **Yazihan N**, Surmeli et al. The importance of sera IGF-1 and VEGF-C/D ratio in lymph node metastasis of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment 2006 (100); S42 sup 1**
2. Kocer B, **Yazihan N**, Surmeli S, Unal B, Aksaray S, Cengiz O, Ataoglu H, Soran A. VEGF-C/D ratio is an important predictive factor to determine lymph node metastasis in breast cancer. ESMO congress, 29.09-03.10.2006, İstanbul Türkiye. **Annals of Oncology, 2006 (17): supp.9: 182**
3. **Yazihan N**, Ataoglu H, Kocak M, Akcil E, Erdem O, Sayal A, Guven C Chronic cadmium toxicity induced midkine and galectin-3 production in rat testis. 6th IC-TST: International Congress of Turkish Society of Toxicology. November 2-5, 2006. Antalya, TURKEY.
4. **Yazihan N**, Uzuner K. A New Aspect to Erythropoietin; Renal NMDA Receptors. IUPS- 2005FASEB-experimental biology-FROM GENOME TO FUNCTION, Sandiego-ABD -Travel grant, 31.03-6.04 2005
5. Ataoglu H, **Yazihan N**, Erkasap N, Sayar K, Kaygisiz Z, Kaya A. Effects of erythropoietin in isolated rat heart cAMP and NO levels. IUPS- 2005FASEB-experimental biology-FROM GENOME TO FUNCTION, Sandiego-ABD, 31.03-6.04 2005
6. Kaygisiz Z, Erkasap N, İkizler M, **Yazihan N**, Sigirci S, Kural T. Erythropoietin changes contractility of isolated rat hearts. International Conference on Physiological Biophysics. November 9-13, 2004, Shanghai, China
7. Uzuner K, **Yazihan N**, Aydın Y, Kuş G. Effects of erythropoietin incubation vascular contractions of diabetic rat aortas. Workshop in Cardiovascular

Physiology, Signal transduction in cardio-vascular system, 13-16 May 2004, Warsaw, Poland, Travel grant, workshop support

8. Uzuner K, **Yazihan N**, Vural M, Köken T, Arslantaş A, Dündar E.

Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. The First International Conference of The National Neuroscience Society of Romania, 26-27 September 2003, Bucharest, Romania. Travel Award-IBRO

9. Erkasap N, Uzuner K, Köken T, Kahraman A, **Yazihan N**. Does Leptin Affect on Renal Tissue TNF- α Level and Lipid Peroxidation After Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. International Symposium ; Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Diagnostic ,Preventive and Therapeutic Values; 8-12 July, 2002 St Petersburg, Russia:

10. Erkasap S, Uzuner K, Erkasap N, Kahraman A, **Yazihan N**. The Effect of Quercetin Pretreatment on Renal Tissue and Serum Nitrite Levels During Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. International Symposium ; Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Diagnostic ,Preventive and Therapeutic Values; 8-12 July, 2002 St Petersburg, Russia:

11. **Yazihan N**, Güler G, Kenar F, Uzuner K, Erkasap N. Effect Of Erythropoietin on Fetal and Placental Development And The Role of Nitric Oxide. 29th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological society (FNPS), September 8-11, 2002 Prague-Czech Republic.

12. **Yazihan N**, Uzuner K, Köken T, Kahraman A, Kenar F. Erythropoietin induced oxidative stress in rat placenta. PhysPharm 2003 Scandinavian Congress of Physiology and Pharmacology, 11-14 october 2003, Odense, Denmark. Poster sunumu

Ulusal kongrelerde sunulmuş bildiriler.

1. **Yazihan N**, Ataoglu H, Yener B, Bozkaya H. Hep3B Hücrelerinde H₂O₂ Toksitesinde PPAR Alfa ve Gama Agonistlerinin Etki Farklılıkları; Olaya Galektin-1 in Katılımı, 6. Ulusal Hepatoloji Kongresi, 7-10 Haziran 2007, İstanbul Poster sunumu

2. **Yazihan N**, Ataoğlu H, Yener B, Aydın C. Hepatositlerde Oluşturulan Hidrojen Peroksit Toksitesinde Eritropoietin'nin Koruyucu Rolü, 6. Ulusal Hepatoloji Kongresi, 7-10 Haziran 2007, İstanbul Poster sunumu
3. **Yazihan N**, Ataoğlu H, Yener B, Mızrak D, Onder O, Bozkaya H, Uzunalimoglu O. Farklı Viral (HBV-HCV) etiyolojili hepatosellüler kanserli hastalarda serum midkin ve galektin-3 düzeylerinin değerlendirilmesi, 6. Ulusal Hepatoloji Kongresi, 7-10 Haziran 2007, İstanbul Sözlü sunum.
4. **Yazihan N**, Ataoğlu H, Yener B, Aydın C, Akçıl E. Kadmiyum Toksitesinde Midkinin Koruyucu Rolü, 6. Ulusal Hepatoloji Kongresi, 7-10 Haziran 2007, İstanbul Poster sunumu
5. **Yazihan N**, Karakurt O, Kocaay F, Ataoğlu H. Eritropoietin tedavisinin U-937 monositlerde LPS uyarımı sonucu sitokin yapımına etkisi. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 32.Ulusal Kongresi 18-22 Eylül 2006, Denizli sözlü sunum
6. **Yazihan N**, Koku N, Ataoğlu H. Testis torsiyonu sonrası gelişen hasarda eritropoietinin koruyucu etkisi. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 32.Ulusal Kongresi 18-22 Eylül 2006, Denizli sözlü sunum
7. **Yazihan N**, Koçak M, Akçıl E, Ataoğlu H. Kronik kadmiyum toksitesine midkin ve galektin-3 ün katılımı. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 32.Ulusal Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 18-22 Eylül 2006, Denizli sözlü sunum
8. Koçer B, **Yazihan N**, Sürmeli S, Ünal B, Cengiz O, Ataoğlu H, Soran A. Meme Kanserli Hastalarda Serum IGF-I, İnsulin Düzeyi ve İnsulin Rezistansının Önemi. Turk Cerrahi Derneği Ulusal Cerrahi Kongresi 24-26 Mayıs 2006, Antalya-sözlü sunum
9. **Yazihan N**, Koçer B, Sürmeli S, Aksaray S, Cengiz O, Ataoğlu H. Meme Kanserli Hastalarda Serum Midkin Ve Galektin Düzeylerinin Klinikopatolojik Parametrelerle Korelasyonu. Turk Cerrahi Derneği Ulusal Cerrahi Kongresi 24-26 Mayıs 2006, Antalya- sözlü sunum
10. Engin D, **Yazihan N**, Kocaay F, Ataoğlu H. Sekans ve genom analizi. 5. istatistik günleri sempozyumu 24-27 mayıs 2006 Antalya sözlü sunum

11. Kocaay F, **Yazıhan N**, Engin D, Ataoğlu H. Enfeksiyöz Hastalıklarında Matematiksel Modellerin Kullanımı. 5. İstatistik Günleri Sempozyumu 24-27 Mayıs 2006 Antalya sözlü sunum
12. **Yazıhan N**, Engin D, Kocaay F, Ataoğlu H. Fizyolojide Matematiksel Modelleme. 5. İstatistik Günleri Sempozyumu 24-27 Mayıs 2006 Antalya sözlü sunum
13. Özbek L, Efe M, **Yazıhan N**, Koksall E. Tümör Hücrelerinin Kılcal Damarlardan Geçirgenliğinin Online Tahmini. 5. İstatistik Günleri Sempozyumu 24-27 Mayıs 2006 Antalya sözlü sunum
14. **N. Yazıhan**, K. Uzuner, Y. Aydın, G. Kuş. Diabetik Sıçanlarda B₁ Ve B₆ Vitamin Tedavisinin Aorta Kasılma Ve Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkileri 30. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31 Ağustos-3 Eylül 2004, KONYA (Genel Tıp Derg 2004;14 (ek):83

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar:

Tubitak Postdoc araştırma bursu, Almanya 2007

Ödüller:

1. Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. Travel grant-Yol, konaklama, kongre ve çalıştay desteği-Romanya; IBRO; 2003
2. Effects of erythropoietin incubation vascular contractions of diabetic rat aortas. Travel grant-Yol, konaklama, çalıştay desteği-Polanya; The physiological Society-UK; 2004
3. Mathematical modelling of kidney- Applied Mathematic in medicine. Yol, konaklama desteği ve araştırma bursu-ABD; Santa Fe Institute-NIH; 2004
4. A New Aspect to Erythropoietin; Renal NMDA Receptors .Travel grant-yol desteği. American Physiology Society; 2005
5. Hep3B Hücrelerinde H₂O₂ Toksitesinde PPAR Alfa ve Gama Agonistlerinin Etki Farklılıkları; Olaya Galektin-1 in Katılımı. Poster 1. Ödülü, Türk Hepatoloji Araştırmaları Derneği; 2007.

Projeleri:

1. Testis Torsiyonunda Eritropoietinin Koruyucu Etkisi (Yürütücü) TUBITAK 2005–(SBAG-AYD-487) Proje tamamlanmıştır.
2. İskemi ve Kanser Olgularına Yeni Bir Yaklaşım: Hücre Kaderinin Ve Davranışının Belirlenmesine Alfa-2 Makroglobulin, Galektinlerin ve Midkinin Katılımı. TUBITAK 2005–Araştırmacı (SBAG-2812-104S329)
3. Farklı viral (HBV-HCV)etiyojili hepatosellüler kanserli hastalarda serum midkin ve galektin-3 düzeylerinin değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi, BAP, 2006-Araştırmacı
4. Renal iskemi reperfüzyon hasarında eritropoietinin koruyucu etkisine K-ATP kanallarının katılımı: Midkin ve galektin-3 düzeylerine etkisi, Ankara Üniversitesi, BAP, 2007, Yürütücü.
5. Nerium Oleander’ın obezite-yangı-diyabet ilişkisindeki etkisinin deneysel tip II diyabetik ratlarda değerlendirilmesi, TUBITAK, 2007, araştırmacı.
6. Meme kanseri taramalarında kullanılan mamografi ve ultrasonografinin maaliyet etkinlik analizi. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı 2007
7. Effects of midkine on alveolar macrophage function, Heidelberg Üniversitesi, Almanya, 2007

Verdiği konferans ya da seminerler:

1. Apoptosis- 2003, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyopatoloji BD
2. Midkin Ailesi- 2004, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyopatoloji BD
3. Eritropoietinin Kardiyovasküler Etkileri-2004, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyopatoloji BD
4. Matematik Modelleme ve Simulasyon-2005, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyopatoloji BD
5. Mitokondrial ATP bağımlı potasyum kanalları-2005, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyopatoloji BD
6. Kemokinler-2006, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Geliştirme Birimi
7. Megalin ve LRP- 2006, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyopatoloji BD

Katıldığı paneller (panelist olarak)

İstatistik Günleri Sempozyumu, Antalya, 24-27 Mayıs 2006

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

1. Nefroloji ve Dializ Kursu: Hacettepe Üniversitesi, Nefroloji AD/Ankara Aralık 1994-Şubat 1995
2. Uluslararası Nefrolojide Yenilikler Kursu: İstanbul; 29 Haziran-2 Temmuz 1997
3. İç Hastalıkları 3. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu: Hacettepe Üniversitesi/Ankara;22-28 Mart 1998
4. Uluslararası Nefroloji-Dializ-Transplantasyon yaz okulu: İzmir; 4-9 Ekim 1998
5. I. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri: OGU/Eskişehir; 11-13 Mart 2002
6. Nefroloji ve Hipertansiyon Kursu; Antalya, 13-14 Eylül 2003
7. The international workshop in neuroscience: Ischemia/hypoxia in the brain; Experimental methods and basic mechanisms: Bucharest, Romania; September 23-25, 2003
8. I. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul, 16-19 Şubat 2004
9. Workshop in Cardiovascular Physiology, Signal transduction in cardio-vascular system, May 13-16 2004, Warszawa, Poland
10. Mathematical and Computer Models in Medicine: Disease and Treatment, Santa Fe, New Mexico, USA, July 25 - August 6, 2004.
11. Otoimmunité ve Otoimmun Hastalıklar Sempozyumu-13-15 Nisan 2005.
A.Ü. Tıp Fakültesi
12. IUPS- 2005FASEB-experimental biology-FROM GENOME TO FUNCTION, San Diego-ABD - 31.03-6.04 2005

13. Optofizyoloji-Konfokal Mikroskopi kursu- 12-13 Kasım 2005- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD, Ankara
14. Moleküler Yaşlanma Çalıştayı, 21-22 Kasım 2005- GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD, Ankara
15. Refleksoloji kursu. 18-22 Eylül 2006 Denizli, Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 32.Ulusal Kongresi
16. RNA interferans kursu 7-10 Nisan 2007, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

1. Uluslararası Öğrenci Transplantasyon Kongresi, 2002, Eskişehir
- İstatistik Günleri Sempozyumu, 2006, Antalya

Diğer üyelikleri