



T.C.

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA L-NAME ile OLUŞTURULMUŞ
HİPERTANSİYONUN KAN TNF- α , ERİTROPOETİN
DÜZEYLERİ ile BÖBREK DOKUSU HARABİYETİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI.**

DOKTORA TEZİ

Arş.Gör. METE ÖZKURT

DANIŞMAN

Prof.Dr. KUBİLAY UZUNER

2015



T.C.

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA L-NAME ile OLUŞTURULMUŞ
HİPERTANSİYONUN KAN TNF- α , ERİTROPOETİN
DÜZEYLERİ ile BÖBREK DOKUSU HARABİYETİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI.**

DOKTORA TEZİ

Arş.Gör. METE ÖZKURT

DANIŞMAN

Prof.Dr. KUBİLAY UZUNER

KABUL VE ONAY SAYFASI

Arş. Gör. Mete Özkurt'un Doktora Tezi olarak hazırladığı "**Sıçanlarda L-NAME ile oluşturulmuş hipertansiyonun kan TNF-alfa, Eritropoietin düzeyleri ile böbrek dokusu harabiyeti arasındaki ilişkinin araştırılması.**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih

12/05/2015

Üye: Prof. Dr. Kubilay UZUNER

Üye: Prof. Dr. Neşe TUNCEL

Üye: Prof. Dr. Hasan V. GUNEŞ

Üye: Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP

Üye: Doç. Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU

K. Özkurt
Neşe Tuncel
Hasan V. Güneş
Nilüfer Erkasap
Bilge Pehlivanoglu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/05/2015 tarih ve 145/4899 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

K. Özkurt
Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda Epo'nun böbreklerden sentezlenmesinin nedeninin Epo'nun böbrekler için yaşamsal bir doku koruyucu olduğunu öne sürdük ve hipertansiyonda oluşan böbrek hasarının başlıca nedeni olan TNF- α 'nın blokajı ve TNF- α tarafından sentezi baskılanan Epo'nun L-NAME modeli ile hipertansiyon oluşturulmuş dişi sıçanlarda böbrek dokusu harabiyeti üzerindeki etkilerini sistemik, moleküler ve histolojik düzeyde araştırmayı amaçladık.

Materyal Metod: a) Doz çalışması: yetişkin dişi sıçanlara 20 mg/kg/gün L-NAME ile birlikte 10, 2,5, 0,5, 0,25, 0,1 μ g/kg dozlarında Depo'yu 3 günde 1 vererek gerçekleştirdiğimiz doz çalışmasında kan parametrelerini değiştirmeyen en yüksek doz olarak 0,25 μ g/kg Depo'yu tedavi dozu olarak belirledik.

b) Tedavi grupları için altmış adet dişi sıçan rastgele 6 gruba ayrıldı, enjeksiyonlar otuz gün boyunca devam etti; Kontrol: günlük intraperitoneal (i.p.) 1 ml/kg serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldı; L: günlük yirmi mg/kg ip L-NAME enjeksiyonu yapıldı; L+Depo: aynı dozda yapılan L-NAME ile birlikte 3 günde 1 ip 0,25 μ g/kg Depo enjeksiyonu yapıldı; L+Rem: aynı dozda yapılan L-NAME ile birlikte TNF- α antikoru olan Remicade 5 mg/kg dozunda ip enjeksiyonu yapıldı; L+Depo+Rem: aynı dozlarda hem L-NAME hem Depo hem de Remicade yapıldı; Depo: aynı dozda Depo tek başına yapıldı. 30 günlük enjeksiyonların ardından yapılan femoral arter kateterizasyonu ile kardiyovasküler parametreler ölçüldü ve arteryel kandan kan sayım cihazı kullanılarak kan değerleri ve plazma Epo ve TNF- α miktarları ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Sağ böbrek çıkartılarak ağırlığı ölçüldü, sol böbrek çıkartılarak uzun hattan ikiye bölündü, yarısı immunhistokimya tekniği ile TUNEL, ED-1 ve NfKappaB boyamalarının yapılması için formolde diğer yarısı ise PCR tekniği ile TNF- α , TNF- α reseptörleri olan TNFR1 ve TNFR2, Epo reseptörü olan EpoR mRNA ölçümleri için tripure solüsyonu içinde saklandı.

Bulgular: L-NAME verilen tüm gruplarda sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı, nabız basıncı ve ortalama arter basıncı artmıştır. L-NAME ile yükselen apoptotik hücre oranı tüm tedavi gruplarında kontrol grubu seviyesine düşmüştür. ED-1 ile ölçülen makrofaj birikimi L ve L+Rem gruplarda yükselmiştir. NfKappaB L+Rem grubu hariç tüm gruplarda kontrole göre artmıştır. ELISA sonuçlarına göre ise, gruplar arasında istatistiksel bir farklılık görülmesi de Epo seviyeleri, L grubunda kontrole göre yarı yarıya düşmüş fakat L+Rem grubunda TNF- α 'nın blokajı Epo seviyesini tekrar kontrol düzeyine yükseltmiştir. Kan plazma TNF- α miktarı ve TNF- α mRNA değerleri L grubunda kontrole göre yaklaşık 3 kat artarken, L+Depo grubunda kontrol değerlerinin bile altına düşmüştür. TNF- α 'nın apoptotik etkilerine aracılık eden TNFR1'in mRNA miktarı gruplar arasında istatistiksel bir farklılık göstermese de, L+Depo grubunda

kontrole göre yarıyarıya düşmüştür. Diğer yandan TNF- α 'nın antiapoptotik etkilerine aracılık eden TNFR2'nin mRNA miktarı ise L+Depo grubunda kontrole göre anlamlı derecede yükselmiştir. EpoR mRNA miktarları istatistiksel olarak anlamlı olmasa da L grubunda kısmen artarken, Depo verilen gruplarda düşmüştür.

Sonuç: Depo injeksiyonu, L-NAME ile oluşturulmuş kronik hipertansiyonda böbrekte oluşan apoptozisi, yükselmiş kan basıncı düzeyini ve kontrol değeri düzeyindeki kan parametrelerini etkilemeden engellemiştir. Bulgularımız Depo'nun bu etkisini makrofaj birikimini engelleyerek, apoptotik plazma TNF- α seviyesini ve TNF- α mRNA düzeyini ve TNFR1 reseptörünü azaltarak fakat antiapoptotik TNFR2 ifadenmesini uyarak gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Sunulan çalışmanın sonuçları ve son yıllarda yayınlanan çalışmaların ışığında Epo ve vücutta hematopoetik bir organ olmasa da majör Epo üreticisi böbrek dokusu ile Epo arasında şu hipotezi ileri sürüyoruz: L-NAME verilerek sıçanlarda oluşturulan kronik hipertansiyonda ortaya çıkan böbrek dokusu hasarı (apoptozis), artan TNF- α aktivitesine bağlı olarak kritik doku koruyucu seviyelerinin altına düşen endojen Epo yetersizliğindedir. Epo'nun hematopoetik etkisi çok düşük konsantrasyonlarda bile gerçekleşirken, doku koruyucu etkisi Epo'ya daha düşük affiniteli bir sitokin reseptörü ile Epo reseptörü arasında heterodimerik bir bağlantı yolağının aktivasyonunu gerektirmektedir. Böbrek dokusunun fizyolojik koşullarda fonksiyonlarının sürdürebilmesi doku koruyucu ve hematopoetik etki seviyelerinin üzerinde Epo varlığına bağlıdır. Böbrek dokusunda üretildiği için böbreklerde doku koruyucu düzeyinde Epo sağlanabilirken kan yoluyla kemik iliğine ulaşabilen pikomolar seviyelerine düşmüş Epo hematopoietik etki için yeterli olabilmektedir. Sunulan çalışmada dışarıdan takviye edilen Epo hipertansiyonda azalan endojen Epo'nun azalan doku koruyucu etkisini telafi ederek böbrek dokusunda hipertansiyonun yol açtığı TNF- α aktivitesine bağlı apoptozisi engellemiştir.

Anahtar Kelimeler: Eritropoetin, Darbepoetin- α , Hipertansiyon, TNF- α , Böbrek Doku Hasarı

SUMMARY

Aim: We hypothesized that Epo is secreted by kidneys because it has an important protector role for kidneys and we aimed to study the effect of TNF-alpha blockage that is the main cause of kidney damage in hypertension and effect of Epo treatment which the synthesis of it is depressed by TNF-alpha on kidney tissue damages by using histological, and molecular techniques in L-NAME induced hypertensive female rats.

Material Method: a) Dose study: To detect the dose of Darbepoetin-alpha (Depo), a long acting Epo analog, we randomly divided 60 female adult rats into six groups; L-NAME alone, L-NAME+10 µg/kg Depo, L-NAME+2,5 µg/kg Depo, L-NAME + 0,5 µg/kg Depo, LNAME+0,25 µg/kg Depo, L-NAME+0,1 µg/kg Depo. According to survival and blood parameters we detected 0,25 µg/kg Depo dose as the highest dose that is not changing the blood parameters and used it as treatment dose.

b) Treatment study: We randomly separated 60 female adult rats into 6 groups and we injected drugs for 30 days, according to the group protocol; Control: Daily i.p. (intra-peritoneal) 1ml/kg/day physiologic serum injected; L-NAME: daily IP 20 mg/kg/day L-NAME injected; L-NAME +Depo: the same dose of L-NAME and 0,25 µg/kg dose of Depo injected once in 3 days i.p; L-NAME+REM: the same dose of L-NAME and Daily 5 mg/kg/day dose of Remicade (REM, TNF-alpha antibody) i.p injected; L-NAME+Depo+REM: the same doses of each agent in the same way injected; Depo: the same dose of Depo alone injected. After 30 days of injection period, rat cardiovascular parameters were recorded under anesthesia (50mg/kg Ketamine HCl+10 mg/kg Xylazine HCl) via PE 50 tip intra-femoral catheterization and at the end of the experiment, arterial blood samples were taken from CBC (all blood cell parameters) via cell counter system and to measure TNF-alpha and Epo levels in the plasma via ELISA technique. We removed right kidney and weighted. Then we removed the left kidney, divided longitudinally into two pieces, half of it was stored in formaldehyde for TUNEL, ED-1 and NfKappaB staining, , the other half was stored in Tri pure solution for TNFalpha, TNFR1, TNFR2 and EpoR mRNA detection.

The results: Systolic, diastolic, mean arterial and pulse pressures increased in all the LNAME given groups and heart rate decreased in only Depo treated with L-NAME groups. Apoptotic index increased in the L - NAME group but decreased in all the treatment groups. Macrophage accumulation, as measured by ED-1 staining, that causes TNF-alpha increase, increased in L and L+ REM groups. NfKappaB increased in all groups except L+REM group. Although ELISA results show no significant difference among the groups, Epo decreased in half in the L group compared with that of the control. However, TNF-alpha blockade in the L REM group increased endogenous Epo up to the control level. The lack of

Epo increase in Depo treated groups may be because of the insensitivity of the Epo antibody used to Depo. TNF-alpha in the blood plasma value detected by ELISA and the TNF-alpha mRNA amount detected by PCR increased up to 3 folds in the L group compared with that of the control and decreased even below the control level in the L Depo group. mRNA amount of TNFR1 that stimulates apoptosis decreased to half in L-NAME treated with Depo groups compared with that of the control group but this result is not statistically significant. On the other hand mRNA amount of TNFR2 that stimulates antiapoptotic pathways, increased significantly in LNAME treated with Depo group. Apr mRNA amount increased partly in the L group may due to increased Epo demand, but this demand was not seen in Depo treated groups that EPOR mRNA also decreased although it is not statistically significant.

Our results suggest that Epo shows its tissue protective activity by blocking the accumulation of macrophages, depressing plasma TNF-alpha level and kidney TNF-alpha mRNA amount, suppressing TNFR1, and stimulating antiapoptotic TNFR2 expression. Apoptosis in the kidney tissue resulted in L-NAME induced hypertension decreased endogenous EPO levels below to the is induced by rising TNF-alpha activity and decreasing below critical tissue protective levels of endogenous Epo during chronic tissue injury.

Conclusion: The presented study is the first in-vivo data indicating that the depo injection or TNF-alpha inhibition prevented apoptosis in rat kidney occurred in L-NAME induced chronic hypertension without affecting rat blood pressures and rat blood cell counts. We suggest that given exogenous DEPO substituted TNF-alpha induced decrease in endogenous renal tissue alpha production below of the critical tissue protective concentrations even it may still enough for the hematopoietic actions. Since Epo can show its hematopoietic influences, even in very low concentrations via the homo dimeric Epo receptors, however its tissue protective effects may depend on tissue-protective erythropoietin receptor (EPOR- common receptor (CR) a currently defined another receptor that requires higher Epo concentrations to activate heterodimeric tissue protective receptor pathways that is a lower affinity to Epo.

Key Words: Erythropoietin, Darbepoetin-alpha, Hypertension, TNF-alpha, Kidney Tissue Damage

İçindekiler

ÖZET	iv
Summary	vi
Tablo Dizini	xi
Şekil Dizini.....	xii
Simge ve Kısaltmalar Dizini.....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Eritropoetin	2
2.1.1. Epo Sentezinin Düzenlenmesi	2
2.1.2. Epo ve Böbrekler	4
2.1.3. Epo ve kardiyovasküler sistem	5
2.1.4. Epo ve Hipertansiyon.....	5
2.1.5. Epo ve İnflamasyon	6
2.1.6. Epo'nun Nonhematopoetik ve Doku Koruyucu Etkisi	7
2.1.7. Farklı Epo Analogları.....	8
2.2. Hipertansiyon	9
2.2.1. Hipertansiyon Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	10
2.2.2. Hipertansiyon ve İnflamasyon.....	12
2.2.3. Hipertansiyon ve Apoptozis.....	13
2.2.4. Deneysel Hipertansiyon Modelleri	14
2.2.5. Hipertansiyon modelinde kullandığımız SD sıçanların fizyolojik değerleri.....	16
2.3. Nitrik Oksit (NO)	16
2.3.1. NO Sentezinin fizyolojik düzenlenmesi	17
2.3.2. L-NAME'in NO Blokajı Yöntemi ile Oluşturulan Hipertansiyon Modeli	18
2.4. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)	18
2.4.1. TNF- α Sentezi	19
2.4.2. TNF- α Reseptörleri	19
2.4.3 Anti-TNF Tedavisi.....	19
2.4.4. İnfliximab'ın Deney Hayvanlarında Kullanımı.....	20
2.5. EPO, TNF ve Hipertansiyon.....	21
3. MATERYAL METOD	22
3.1. Deney Hayvanları.....	22
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22

3.1.2. Kullanılan Cerrahi Aletler.....	22
3.1.3. Diğer Araç ve Gereçler.....	22
3.1.4. Deney Protokolü.....	23
3.1.5. Anestezi ve Operasyona Hazırlık	24
3.1.6. Femoral Arter ve Ven Kateterizasyonu	24
3.2. Kan Parametrelerinin Ölçülmesi.....	25
3.3. Real-Time PCR Tekniği ile TNF- α , TNFR1, TNFR2 ve EpoR mRNA Miktarlarının Relatif Ölçülmesi	25
3.3.1 Total RNA İzolasyonu.....	25
3.3.2. Total mRNA'lardan cDNA sentezi	26
3.3.3. Primer Dizilerinin Hazırlanması	26
3.3.4. Real-Time PCR	27
3.4. ELISA Yöntemi ile Kan Plazmasından TNF- α ve EPO miktarı Tayini	27
3.5. Histolojik Yöntemlerle Doku Hasarı ve Protein Tayini.....	28
3.5.1. Periodic Acid Schiff's (PAS) Boyaması.....	28
3.5.2. Masson's Trichrome Boyaması.....	29
3.5.3. İmmunohistokimyasal Boyamalar	29
3.5.4. TUNEL Yöntemi.....	30
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. Farklı Dozlarda Kullanılan Darbepoetin- α 'nın	31
Sıçan Yaşam Süreleri Üzerine Etkileri	31
4.2. Farklı Dozlarda Kullanılan Darbepoetin- α 'nın Sıçan Kan Parametreleri Üzerine Etkisi	32
4.2.1. Alyuvarlar.....	33
4.2.2. Hematokrit	35
4.2.3. Hemoglobin	37
4.2.4. MCH.....	36
4.2.5. Akyuvarlar.....	37
4.2.6. Trombositler	38
4.3. Tedavi Grupları Arasında Ağırlık Değişimleri	39
4.3.1. Başlangıç Vücut Ağırlığı.....	39
4.3.2. Bitiş Vücut Ağırlığı.....	40
4.3.3. Böbrek Ağırlığı	41
4.4. Tedavi Grupları Arasında Kardiyovasküler Parametreler	42

4.4.1. Sistolik Kan Basıncı	43
4.4.2. Diyastolik Kan Basıncı	44
4.4.3. Nabız Basıncı.....	45
4.4.4. Ortalama Arter Kan Basıncı	46
4.4.5. Kalp Hızı	47
4.5. İmmunhistokimya Sonuçları.....	48
4.5.1. H&E Boyama.....	48
4.5.2. Masson's Trichrome Boyama	49
4.5.3. PAS Boyama.....	49
4.5.4. TUNEL Boyama	50
4.5.5. ED1 Boyama.....	51
4.5.6. NfKappaB Boyama	53
4.6. ELISA Sonuçları	55
4.6.1. Epo ELISA	55
4.6.2. TNF- α ELISA	56
4.7. PCR Sonuçları.....	58
4.7.1. TNF- α PCR.....	58
4.7.2. TNFR1 PCR	59
4.7.3. TNFR2 PCR	60
4.7.4. EpoR PCR	61
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
7. Kaynaklar dizini.....	77
8- ÖZGEÇMİŞ	84

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1.	:Antihipertansif İlaçların Sınıflandırılması
Tablo 2.2.	:SD Sıçanların Fizyolojik Değerleri
Tablo 3.1.	:Real-time PCR için Karışım İçeriği
Tablo 4.1.	:Yaşam Süreleri İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.a.	:Kan Değerleri - Alyuvarlar İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.b.	:Kan Değerleri - Alyuvarlar-2 İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.c.	:Kan Değerleri - Hematokrit İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.d.	:Kan Değerleri - Hematokrit-2 İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.e.	:Kan Değerleri - Hemoglobin İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.f.	:Kan Değerleri - Hemoglobin-2 İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.g.	:Kan Değerleri - MCH İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.h.	:Kan Değerleri - MCH-2 İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.i.	:Kan Değerleri - Akyuvarlar İstatistik Tablosu
Tablo 4.2.j.	:Kan Değerleri - Trombositler İstatistik Tablosu
Tablo 4.3.a.	:Ağırlık Değerleri - Başlangıç Ağırlığı İstatistik Tablosu
Tablo 4.3.b.	:Ağırlık Değerleri - Bitiş Ağırlığı İstatistik Tablosu
Tablo 4.3.c.	:Ağırlık Değerleri - Böbrek Ağırlığı İstatistik Tablosu
Tablo 4.4.a.	:Kan Basıncı Değerleri - Sistolik Kan Basıncı İstatistik Tablosu
Tablo 4.4.b.	:Kan Basıncı Değerleri - Diyastolik Kan Basıncı İstatistik Tablosu
Tablo 4.4.c.	:Kan Basıncı Değerleri - Kalp Hızı İstatistik Tablosu
Tablo 4.4.d.	:Kan Basıncı Değerleri - Nabız Basıncı İstatistik Tablosu
Tablo 4.4.e.	:Kan Basıncı Değerleri - Ortalama Arter Kan Basıncı İstatistik Tablosu
Tablo 4.5.a.	:İmmunhistokimya Değerleri - TUNEL % Apoptotik İndeks İstatistik Tablosu
Tablo 4.5.b.	:İmmunhistokimya Değerleri - ED-1 İstatistik Tablosu
Tablo 4.5.c.	:İmmunhistokimya Değerleri - NfKappa-B İstatistik Tablosu
Tablo 4.6.a.	:ELISA Sonuçları - Epo İstatistik tablosu
Tablo 4.6.b.	:ELISA Sonuçları - TNF- α İstatistik Tablosu
Tablo 4.7.a.	:PCR Sonuçları- TNF- α mRNA İstatistik Tablosu
Tablo 4.7.b.	:PCR Sonuçları- TNFR1 mRNA İstatistik Tablosu
Tablo 4.7.c.	:PCR Sonuçları- TNFR2 mRNA İstatistik Tablosu
Tablo 4.7.d.	:PCR Sonuçları- EpoR mRNA İstatistik Tablosu

ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 2.1.** :Epo Sentezinin Düzenlenmesi
Şekil 2.2. :Farklı Epo Analoglarının Metabolizma Yarı Ömürlerinin Karşılaştırılması
Şekil 2.3. :Hipertansiyon Patogenezi
Şekil 2.4. :İnflamasyon ve Hipertansiyon
Şekil 2.5. :Apoptoz Mekanizması
Şekil 2.6. :NO Sentezi
Şekil 2.7. :TNF- α Antikorları
Şekil 3.1. :Femoral Arter ve Ven Kateterizasyonu
Şekil 4.1. :Yaşam Süreleri
Şekil 4.2.a. :Kan Değerleri – Alyuvarlar
Şekil 4.2.b. :Kan Değerleri – Alyuvarlar-2
Şekil 4.2.c. :Kan Değerleri – Hematokrit
Şekil 4.2.d. :Kan Değerleri – Hematokrit-2
Şekil 4.2.e. :Kan Değerleri – Hemoglobin
Şekil 4.2.f. :Kan Değerleri – Hemoglobin-2
Şekil 4.2.g. :Kan Değerleri – MCH
Şekil 4.2.h. :Kan Değerleri – MCH-2
Şekil 4.2.i. :Kan Değerleri – Akyuvarlar
Şekil 4.2.j. :Kan Değerleri – Trombositler
Şekil 4.3.a. :Ağırlık Değerleri - Başlangıç Ağırlığı
Şekil 4.3.b. :Ağırlık Değerleri - Bitiş Ağırlığı
Şekil 4.3.c. :Ağırlık Değerleri - Böbrek Ağırlığı
Şekil 4.4.a. :Kan Basıncı Değerleri - Sistolik Kan Basıncı
Şekil 4.4.b. :Kan Basıncı Değerleri - Diyastolik Kan Basıncı
Şekil 4.4.c. :Kan Basıncı Değerleri - Kalp Hızı
Şekil 4.4.d. :Kan Basıncı Değerleri - Nabız Basıncı
Şekil 4.4.e. :Kan Basıncı Değerleri – Ortalama Arter Kan Basıncı
Şekil 4.5.a. :İmmunhistokimya Değerleri- H&E Boyama Görüntüsü
Şekil 4.5.b. :İmmunhistokimya Değerleri – Masson Trichrome Boyama Görüntüsü
Şekil 4.5.c. :İmmunhistokimya Değerleri – PAS Boyama Görüntüsü
Şekil 4.5.d. :İmmunhistokimya Değerleri - TUNEL Boyama % Apoptotik İndeks Görüntüsü
Şekil 4.5.e. :İmmunhistokimya Değerleri - TUNEL Boyama % Apoptotik İndeks Grafik
Şekil 4.5.f. :İmmunhistokimya Değerleri - ED-1 Boyama Görüntüsü
Şekil 4.5.g. :İmmunhistokimya Değerleri- ED-1 Boyama Grafik
Şekil 4.5.h. :İmmunhistokimya Değerleri – NfKappaB Boyama Görüntüsü

- Şekil 4.5.i** :İmmunhistokimya Değerleri – NfKappaB Boyama Grafik
- Şekil 4.6.a.** :ELISA Sonuçları- Epo
- Şekil 4.6.b.** :ELISA Sonuçları- TNF- α
- Şekil 4.7.a.** :PCR Sonuçları- TNF- α mRNA
- Şekil 4.7.b.** :PCR Sonuçları- TNF- α R1 mRNA
- Şekil 4.7.c.** :PCR Sonuçları- TNF- α R2 mRNA
- Şekil 4.7.d.** :PCR Sonuçları- EpoR mRNA
- Şekil 5.1.** :Epo'nun T hücreleri aracılığıyla makrofaj aktivasyonunu engellemesi
- Şekil 5.2.** :Hipertansiyonda ortaya çıkan infalmasyon ve Epo'nun inflamasyonda doku koruyucu etkisi
- Şekil 5.3.** :Epo'nun doku koruyucu etkisinin moleküler mekanizması

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	:Anjiyotensin Dönüştürücü (Converting) Enzim
asialoEPO	:Deasilizasyon işlemi uygulanmış Eritropoetin
ASK	:Apoptozis Signal-Regulating Kinaz
CaM	:Kalsiyum kalmodulin
CBP	:CREB binding protein
CEPO	:Karbamilasyon işlemi uygulanmış Eritropoetin
CKD	:Kronik Böbrek Hastalığı
cNOS	:Serebral Nitrik Oksit Sentaz
CREB	:cAMP Response Element-Binding Protein
Ct	:Cycle Treshold
Depo	:Darbepoetin- α
DOCA	:Deoksikortikosterone
EDTA	:Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA	:Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
eNOS	:Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
Epo	:Eritropoetin
EpoR	:Eritropoetin Reseptörü
H&E	:Hematoksin ve Eozin
HBSP	:Helix B-surface peptid
HIF	:Hipoksi İndükleyici Faktör
I/R	:İskemi Reperfüzyon
IL-1 β	:İnterleukin-1 β
INF- γ	:İnterferon- γ
i.v.-i.p.	:Ven içi -periton içi
iNOS	:Uyarılabilir (İnducible) Nitrik Oksit Sentaz
JAK-2	:Janus Kinaz-2
JNK	:c-Jun N-terminal Kinaz
L-NAME	:N ^{ω} -nitro -L-arjinin Metil Ester
L-NMMA	:N ^{ω} -monometil-L-arjinin
LPS	:Lipopolisakkarit
MAPK	:Mitojen-Activated Protein Kinaz
MDA	:Malondialdehit
MI	:Miyokardiyal İnfarktüs
NfKappaB	:Nükleer faktör kappa-B
NO	:Nitrik Oksit
NOS	:Nitrik Oksit Sentaz
PAS	:Periodik Asit Schiff's
PBS	:Fosfat Buffer Tamponu
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHD-1, -2, -3	:Pirrolil Hidroksilaz
PI-3K/Akt	:Fosfoiyonosit-3 Kinaz/Protein Kinaz-B
PKC	:Protien Kinaz-C
RAAS	:Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
Rem	:Remicade

RES	:Epo reseptörünün knockout edildiği farelerin yaşayabilmesi için hematopoetik hücrelerine EpoR geninin yeniden transfer edildiği transgenik fare modeli
rhEpo	:Rekombinant İnsan (human) Eritropoetin
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	:Real-Time PCR
SD	:Sprague Dawley
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
SF	:Serum Fizyolojik
SOD	:Süper Oksit Dismutaz
STAT-1, 3, 5	:Signal Transducer and Activator of Transcription
sTNF-R	:Çözünebilir TNF Reseptörü
TdT	:Deoksinükleotidil Transferaz
TNF- α	:Tümör Nekroz Faktör- α
TNFR1	:Tümör Nekroz Faktör- α Reseptör 1
TNFR2	:Tümör Nekroz Faktör- α reseptör 2
TUNEL	:Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
WT	:Yabanıl Tip

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hematopoezin hormonal bir yolla uyarıldığına tespit edildiği 1906 yılından ve bu hormonun "Eritropoetin" olarak isimlendirildiği 1948 yılından beri yaklaşık 100 yıldır pek çok farklı araştırmanın konusu olan Eritropoetin (Epo), pek çok canlı türünde varlığı gösterilmiş pleotropik bir hormondur. Son yıllarda sayıları gittikçe artan ve büyük bir ilgiyle karşılanan pek çok araştırma sonuçlarının da gösterdiği gibi Epo hematopoetik etkilerinin yanında çok önemli doku koruyucu etkileri de bulunmaktadır. Diğer yandan böbrekler uzun süreli kan basıncının düzenlenmesinde mutlak gerekli bir organ olup, vücutta sentezlenen Epo'nun %90'ı böbreklerin peritubuler bölgesinde bulunan fibroblastlar tarafından yapılır ve kana verilir. Böbrekler yaşamın hiçbir döneminde hematopoetik olmadığı halde Epo'nun neden böbreklerde sentezlendiği sorusu bugüne kadar tam olarak açıklanamamıştır. Kan basıncının fizyolojik ihtiyaçlara göre düzenlenmesi böbrek fonksiyonlarının sürdürülebilmesine bağlıdır. Bu nedenle böbreklerin her türlü hasara karşı korunması yaşamsal öneme sahiptir(W. Jelkmann, 2007).

MÖ 2600 yılından beri insanlığın tedavi etmeye çalıştığı hipertansiyon bugün insan ölümlerine sebep olan hastalıklar arasında birinci sırada bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmaya göre her üç yetişkin Amerikalıdan biri hipertansiftir ve hipertansiyon kaynaklı ölümler 1999'dan 2009 yılına kadar %17,1 oranında artmıştır. Ülkemizde ise 2004 yılı verilerine göre her dört ölümden birinin nedeni hipertansiyondur. Bu hastalığın sıklıkla ölümlere yol açmasının temel sebebi kronik yüksek kan basıncının beyin, kalp, böbrek gibi yaşamsal organlar üzerinde yarattığı inflamasyon kaynaklı dejenerasyondur (Esunge, 1991; "High Blood Pressure - 2013 Statistical Fact Sheet," 2013; "Türk hipertansiyon insidans çalışması," 2008).

İnflamasyonlu hastalıkların ve de hipertansiyon gibi inflamatuvar bir cevaba neden olan bütün hastalıkların başrol oyuncusu konumundaki TNF- α 'nın Epo'yu baskılayıcı özelliği olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada vücudun majör vazodilatörü olan nitrik oksiti (NO) sentezleyen nitrik oksit sentaz enziminin L-NAME ile 4 hafta boyunca sistemik olarak blokajı yoluyla oluşturulmuş kronik hipertansiyonlu sıçanlarda in-vivo yöntemler, histolojik ve moleküler teknikler kullanılarak TNF- α , Epo ve böbrek dokusu harabiyeti arasındaki bağlantıları analiz ederek hipertansiyonda görülen böbrek dokusu harabiyeti ve Epo'nun doku koruyucu etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu yöntemle Epo'nun böbrek dokusunu koruyucu etkisini gösterebilmek aynı zamanda Epo'nun neden böbreklerden salgılandığına dair de yeni bir yaklaşım geliştirebilmemizi sağlayacaktır(La Ferla, 2002).

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Eritropoetin

Yüksek irtifada oksijen yetersizliğine bağlı olarak, serumda bulunan bir hormon tarafından eritrosit sayısının arttırıldığıının bulunması ve bu hormona hemopoetin adının verilmesinin üzerinden yaklaşık yüz yıldan fazla süre geçmiştir. Epo'nun izole edilmesi ve anemi hastalarında tedavi edici olarak kullanılması ise yaklaşık 50 yıldır sürmektedir. Epo ve reseptörünün kurbağalar, Japon balıkları gibi ilkel canlılarda da tespit edilmesi ve bu canlılarda da benzer görevleri olması, Epo'nun canlıların evrimi içinde çok eski zamanlardan beri var olduğunu göstermiştir. (Aizawa et al., 2005; W. Jelkmann, 2007; Katakura, Katzenback, & Belosevic, 2014).

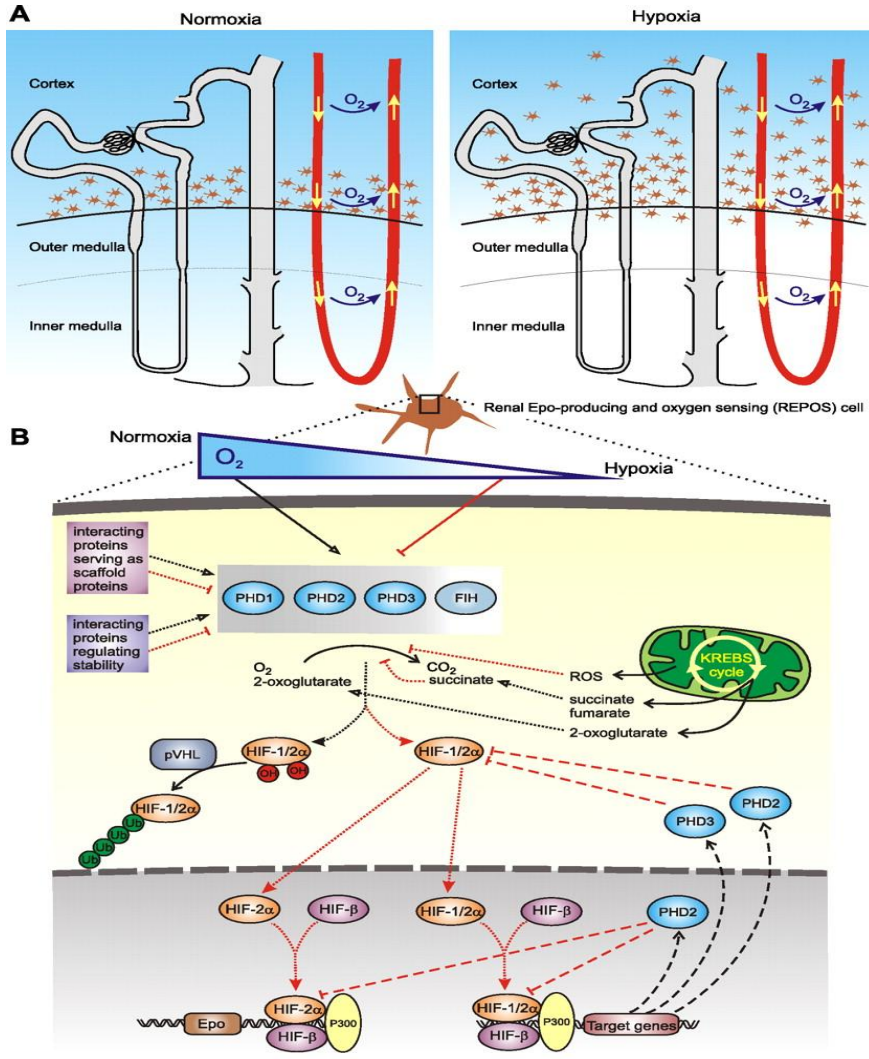
Epo 34,4 kD ağırlığında, 165 aminoasit ve dört glikan içeriği olan bir glikoproteindir. Fetal dönemde hepatositlerde üretildiği bilirse de böbrek, kemik iliği ve dalakta az miktarda da olsa Epo mRNA'ları bulunmuştur. Doğumdan sonra üretim yeri ise renal korteksin peritubuler fibroblastlarıdır. Üretilen Epo, kan dolaşımı ile kemik iliğine gelir, burada kendisine spesifik reseptörü EpoR aracılığıyla eritrositlerin, kök hücrelerden başkalaşarak sentezlenmesini sağlar ve de bu hücreleri apoptozdan koruyarak kan eritrosit miktarının düzenlenmesini sağlar. EpoR; 57 kDa ağırlığında, 484 amino asit içeren iki transmembran glikoproteinden oluşan bir homodimerdir. Epo'nun reseptörüne bağlanması bu reseptörde konfirmasyonel bir değişikliğe yol açar ve bu da Janus Kinaz-2'nin (JAK-2) transfosforilasyonuna sebep olur. JAK-2 hücre içinde Fosfoiyonosit-3 Kinaz/Protein Kinaz-B (PI-3K/Akt), Mitojen-Activated Protein Kinaz (MAPK), Protein Kinaz-C (PKC) ve Signal Transducer and Activator of Transcription -1, 3, 5 (STAT) yolaklarını aktive eder. Böbrekler dışında kardiyovasküler sistem organları, beyin, karaciğer, dalak ve testislerde de Epo mRNA'sına ve Epo reseptörüne rastlanmış olsa da Eponun bu organlardaki etkinliği hala tartışmalıdır (Dame, 1998; Ebert, 1999; W. Jelkmann, 2011; W. Jelkmann, Elliot, S., 2013; Koury, 1990; Testa, 2004).

2.1.1. Epo Sentezinin Düzenlenmesi

İn vivo ve in vitro ortamlarda yapılan deneyler ile Epo'nun sentezini uyaran hipoksi gibi pek çok fizyolojik ve farmakolojik sinyalin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Kan kaybı yoluyla anemi oluşturulan farelerin böbreklerinde Epo mRNA miktarının 4-8 saat içerisinde 200 katına kadar çıktığı gözlenmiş ve bu etkinin aneminin derinliğine bağlı olduğu bildirilmiştir (Bondurant, 1986; Ebert, 1999).

Normoksik koşullarda Epo geninin promotor bölgesi GATA-2'nin ve NfKappaB'nin baskısı altındadır ve bu durum inflamatuvar hastalıklara bağlı gelişen anemilerin nedeni olarak görölmektedir. Hipoksi koşullarında ise GATA-2 hızlıca azalırken, hypoxia-inducible transcription factors (HIF) adı verilen transkripsiyon proteinleri hipoksiye cevap olarak sentezlenen pek çok başka proteinle birlikte ve en fazla Epo sentezini uyarır. HIF'ler 120 kDa ağırlığında oksijene kararsız bir α (1 α , 2 α , 3 α izoformları vardır) ve 90-95 kDa ağırlığında kararlı bir β alt ünitelerden oluşur. İlk keşfedilen HIF-1 olsa da daha sonra keşfedilen HIF-2 α 'nın serum Epo seviyesinin düzenlenmesinde temel aktör olduğu bulunmuştur (W. Jelkmann, 2011; W. Jelkmann, Elliot, S.,, 2013; Tsuchiya, 1997; Warnecke, 2004).

HIF- α alt biriminin C-ucu, oksijen varlığına bağımlı bir bozulma bölgesi içerir ve HIF- α oksijen varlığında özel bir Fe⁺² içeren pirolil hidroksilaz (PHD-1, -2, -3) tarafından indirgenir. Oksijen yokluğunda ise HIF'ler p-300 ve CBP (cAMP response element-binding protein(CREB) co-aktivatörlüğünde Epo mRNA'sının transkripsiyonunu uyarır. PHD-2 ve PHD-3'de birer HIF hedef genidir ve bu geri bildirim mekanizması kronik anemi ya da uzun süreli yüksek irtifada bulunma gibi durumlarda sabit kalan Epo miktarını açıklar (Şekil 2.1) (Bruick, 2001; W. Jelkmann, 2011; Wenger, 2010).



Şekil 2.1. Epo sentezinin düzenlenmesi. A) Hipoksiye cevap olarak Epo sentezleyen hücrelerin artması. B) Epo sentezleyen hücrelerde hipoksi ile birlikte PHD'lerin HIF üzerindeki baskısının kalkması ve HIF'lerin hücre çekirdeğine geçip Epo sentezini uarması. (Wenger, 2010)

2.1.2. Epo ve Böbrekler

Yukarıda da belirtildiği gibi doğumdan sonra Epo'nun ana üretim merkezi böbrekler haline gelir ve Epo'nun %90'ı böbreklerde jukstamedullar bölgede bulunan fibroblastlardan sentezlenir. Yaşamın hiçbir evresinde hematopoetik olmayan böbreklerde Epo'nun neden sentezlendiği ise henüz tam olarak açıklanamamıştır. Literatürde geçen genel kabul böbreklerin kan oksijen doygunluğunu moniterize etmek için uygun bir organ olduğu fikri etrafında yoğunlaşıyor. Buna göre oksijeni monitörize eden karotid cisim akciğerlerden gelen taze kandaki parsiyel oksijen basıncına duyarlıdır ve parsiyel oksijen basıncındaki değişikliklere göre akciğerlerin hızlı cevap vermesini; alveolar ventilasyonun artmasını ya da azalmasını sağlar. Böbreklerde ise medullaya yakın bölgede bulunan fibroblastlara ulaşan oksijen diffuzyonla ulaşır. Bu sayede bu hücreler

kandaki parsiyel oksijen basıncı değil dokulara ulaşan oksijen miktarını ölçerek Epo sentezi aracılığıyla kanın hemoglobinlerle oksijen taşıma kapasitesini artırır. Bu yaklaşım doğru ancak yetersizdir; çünkü böbreklerin fizyolojik fonksiyonlarından kaynaklı benzer pek çok yaklaşım geliştirmek mümkünken Epo için özel olan durumu açıklamamaktadır. Böbreklerin tespit edebildiği kan basıncında ve kanın ozmolaritesindeki değişiklikler gibi tüm değişikliklere böbrekler doğrudan çeşitli mekanizmalarla müdahale ederken Epo sentezlenmekte, dolaşıma girmekte ve doku oksijenizasyonun karşı cevabı olan hematopoezi kemik iliğinde gerçekleştirmektedir. Epo'ya özel olan bu duruma dair yeni ve daha gelişkin açıklamalar getirilmesi gerekmektedir(Wenger, 2010).

2.1.3. Epo ve kardiyovasküler sistem

Wu H. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Epo veya EpoR geninin susturulduğu (knockout edildiği) farelerde kalp ve damar sisteminde gelişim bozuklukları görülmüştür. Daha sonra bu çalışma Kertsz N. ve arkadaşları tarafından da desteklenmiştir. Fakat Suzuki N. ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise sadece hematopoetik organlarda EpoR ifadenmesinin engellenmesi ile fareler normal gelişim göstermişlerdir. Bu bilgilerle birlikte EpoR'nin vasküler endotelial hücrelerdeki fonksiyonel varlığı protein düzeyinde henüz gösterilemediği halen çok tartışmalıdır (W. Jelkmann, Elliot, S., 2013; Kertesz, 2004; Suzuki, 2002; H. Wu, Lee, S.H., Gao, J., Liu, X., Iruela-Arispe, M.L., 1999).

Epo'nun kalpte doğrudan bir etkisinin olup olmadığı da benzer bir şekilde tartışmalıdır. Literatürde kalp rahatsızlıkları olan hastalar üzerinde yapılan deneylerde kullanılan Epo'nun olumlu etkilerinin yanısıra etkisiz olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (W. Jelkmann, Elliot, S., 2013).

Yüksek dozda verilen Epo'nun in-vitro koşullarda düz kaslar üzerine kontraktif etkilerinin olmasına rağmen in-vivo ortamda bu etkilerin gözlenmemesi Epo'nun damar endotelini geçememesinden kaynaklanmaktadır (W. Jelkmann, Elliot, S., 2013).

Bütün bu bilgilerle birlikte, Epo ve EpoR'nin kalp damar dokularındaki varlıkları bu sistem üzerindeki etkilerinin daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir.

2.1.4. Epo ve Hipertansiyon

Kronik böbrek hastalarında görünen anemiye karşı tedavi olarak verilen Epo'nun bu hastalarda birkaç hafta ile birkaç ay arasında arteriyel kan basıncında artışa ve hipertansiyona sebep olduğu görülmüştür. Benzer bir durum kronik böbrek hastalığı oluşturulan sıçanlarda birkaç hafta içinde gerçekleşmiştir. İlk bakışta artan hematokrit seviyesine bağlı kanın vizkozite artışı ile ilişkilendirilen bu durumun yapılan deneylerle hematokrit

ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Kronik böbrek hastalığı modeli oluşturulan, demir eksikliği olan ve olmayan sıçanlara verilen Epo'nun kan basıncını arttırdığı görülmüştür. Daha sonra eritrosit transfüzyonu ile benzer hematokrit seviyelerine ulaştırılan kronik böbrek hastalıklı sıçanlarda ise kan basıncında herhangi bir artış gözlenmemiştir (W. Jelkmann, Elliot, S., 2013; Kertesz, 2004; Vaziri, 1999).

Henüz in-vivo ortamda ispat edilememiş olsa da in-vitro ortamda Epo'nun damar epitel ve düz kaslarında DNA sentezi ve hücre proliferasyonunu artırdığı gözlenmiştir. Bu durum; daha sonra yapılacak çalışmalarla in-vivo ortamda da gösterilebilirse Epo'nun damar yapılanmasını artırarak hipertansiyona sebep olduğu söylenebilir (Vaziri, 1999).

Önemli bir vazodilatör olan NO'nun, kronik Epo uygulamalarıyla birlikte vazodilatör etkisinde ciddi bir azalma olduğu ve bir direnç ile karşılaştığı gözlenmiştir. Üç hafta boyunca Epo verilen sıçanların idrarlarında NO metabolitlerinde bir artış gözlenmiş ve bu durum fizyolojik etkisini gösteremeyen NO'nun vücut tarafından daha fazla sentezlenmeye başladığını göstermiştir. Epo'nun Ca^{++} endoplazmik retikuluma geri alımını artırıcı özelliği hem NO'ya karşı gelişen direnci hem de oluşan yüksek kan basıncını anlatmaya katkı sunmaktadır. Çünkü NO vazodilatör etkisini hücre içi Ca^{++} depolarını azaltarak gerçekleştirmektedir. Ayrıca Epo uygulamalarıyla birlikte artan hemoglobinin önemli bir NO temizleyicisi olduğu bilinmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, Epo kaynaklı hipertansiyonu açıklamaya en yakın teori bu fenomen olarak görünmektedir (Azarov, 2005; Moreau, 2000; Vaziri, 1999).

2.1.5. Epo ve İnflamasyon

Kronik böbrek hastalığı olan insanlarda oluşan anemi, inflamasyon ve Epo sentezi arasında bir ilişki olabilir mi sorusunu ortaya çıkarmıştır. Bu hastalarda yapılan bir çalışma, TNF- α blokajının Epo seviyesi üzerine doğrudan bir etkisinin olmadığını gösterse de in-vivo, in-situ ve in-vitro çalışmalar TNF- α 'nın Epo sentezini baskıladığını göstermiştir. Bu etki Johnson C.S. ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları çalışma ile Jelkmann W. ve arkadaşlarının izole böbrek ve insan hepatoma hücrelerinde yaptıkları çalışmalarla ortaya konmuştur. La Ferla K. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise TNF- α 'nın Epo sentezini baskılayıcı etkisinin GATA-2 ve NfKappaB'nin, Epo geninin promotor bölgesinde yaptıkları blokaj ile gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir (W. Jelkmann, Hellwig-Buerger, T., 1999; Johnson, 1990; La Ferla, 2002)

2.1.6. Epo'nun Nonhematopoetik ve Doku Koruyucu Etkisi

Epo ve reseptörünün hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde farklı organlardaki varlığı halen bir tartışma konusu olsa da bu tartışmanın bir benzeri Epo'nun doku koruyucu etkisi üzerinde yapılmaktadır. Bugün pek çok araştırmacı yayınladıkları makaleler ile Epo'nun doku koruyucu etkisinin varlığını ispat etmeye çalışmaktadır. Beyinde astrositlerden salınan Epo'nun doku koruyucu etkisi sinir bilimleri açısından üzerinde yoğun çalışılan bir başlıktır. Beyindeki etkisinden sonra ise en çok çalışılan konu ise Epo'nun kardiyovasküler sistem üzerindeki doku koruyucu etkisidir (M. Brines, Cerami, A., 2005; Nangaku, 2013; L. Wang, Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., Chopp, M., 2004).

Tada H. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sadece non-hematopoetik organlarda Epo reseptörünün baskılandığı bir fare modeli kullanmışlardır (RES). RES farelerinde wild type (WT) farelere göre hematokrit, vücut ve kalp ağırlıkları gibi parametreler aynı kalırken, RES fareleri görece daha fazla Epo sentezlemektedir. RES farelerinde oluşturdukları miyokardiyal iskemi/reperfüzyon (İ/R) sonrasında infarkt alanı WT farelerde RES farelerine göre anlamlı olarak azalmış, WT farelerde aynı zamanda apoptosis ve apoptosis mekanizmasının önemli bir proteini olan caspase3 proteini de RES farelerine göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu bulgular Epo-EpoR etkileşiminin, non-hematopoetik organlarda, caspase-3 aktivitesini baskılayarak, apoptozu engellemek yoluyla doku koruyucu etkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır. (Tada, 2006).

Lipsic E. ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptıkları bir miyokard infarktüsü (Mİ) modelinde, hematokrit seviyesini artıracak ve artırmayacak iki farklı Depo dozunu denemişlerdir. Hematokrit seviyesini artırmayan düşük doz, kardiyovasküler parametreleri ve Mİ operasyon (sham) grubuna göre anlamlı derecede artırırken caspase3 aktivitesini ise aynı gruba göre anlamlı derecede düşürmüştür (Lipsic, 2006).

Sharples E.J. ve arkadaşlarının sıçanlarda böbrek İ/R modeli oluşturarak yaptıkları bir çalışmada ise Epo, İ/R uygulanan böbreği ürodinamik parametreler, histolojik parametreler ve caspase3 aktivitesi açısından korumuştur (Sharples, 2004).

Her ne kadar yapılan bir sepsis çalışmasında Epo'nun NfKappaB'yi baskılandığı iddia edilse de bu konuda çalışan başka araştırmacılar Epo'nun doku koruyucu etkisini NfKappaB'yi aktive ederek ve bu yolla anti-apoptotik proteinlerin sentezini uyararak gerçekleştirdiğini iddia etmektedir (Sharples, 2004; Souza, 2012).

Yukarıdaki çalışmaların yanında özellikle son yıllarda öne çıkan görüş, Epo'nun klasik homodimer reseptörünün dışında, hematopoetik olmayan organlarda IL-3 ve IL-5 ile birlikte heterodimerik beta-common reseptöre

(β cR) de daha düşük afiniteyle bağlanabildiğini ve bu reseptör üzerinden eritropoezi etkileyemezken doku koruyucu bir etki gösterdiği. Coldewey S. M. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada sepsis ile akut böbrek hasarı oluşturulan farelerde Epo'nun doku koruyucu etkisi gözlenmiş ve bu etkinin β cR geni susturulduğunda ortadan kalktığı rapor edilmiştir. Brines M. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise farklı organlardan köken alan hücre gruplarında hem Epo'nun hemde Epo'nun eritropoetik olmayan bir analogu olan Cepo benzer biçimde β cR geni susturulduğunda koruyucu bir etki gösterememiş fakat β cR varlığında doku koruyucu etki göstermişlerdir. Bu verilerle birlikte Brines M. ve Cerami A.'nın 2013 yılında yazdıkları bir derlemede belirttikleri üzere Epo'nu β cR üzerinden olan etkileri henüz üzerinde daha fazla çalışmayı gerektirmektedir (M. Brines, Cerami, A., 2005, 2013; M. Brines, Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q., Smart, J., Su-Rick, C., Pobre, E., Diaz, D., Gomez, D., Hand, C., Coleman, T., Cerami, A. , 2004; Coldewey, 2013).

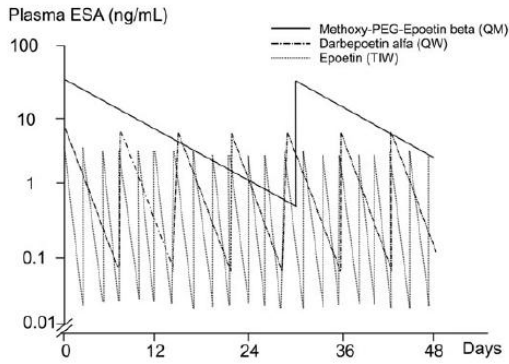
2.1.7. Farklı Epo Analogları

Farklı Epo analogları araştırmalarının iki temel sebebi olduğu görülmektedir; Epo'nun doku koruyucu etkisi üzerinde çalışan araştırmacıların çözmeye çalıştıkları bir sorun olarak Epo'nun hematopoetik etkilerini engellemek ve anemide kullanılan Epo tedavilerini daha etkin hale getirmek.

Epo'nun ekzojen olarak verildiğinde ortaya çıkan etkilerini engelleyerek, doku koruyucu etkisini ortaya çıkarmaya çalışan araştırmacılar, Epo'nun yapısı ile oynayarak kemik iliğinde bulunan EpoR'ye bağlanmayan bununla birlikte özellikle beyinde bulunan reseptörlerine bağlanan farklı Epo mutantları ortaya çıkarmışlardır. Protienlerin sialic asit bileşimlerini sialidaz enzimleriyle düzenleme işlemi olan desializasyon işlemi uygulanan Epo (asialoEPO) EpoR'ye bağlanmış ve bunun yanında çok kısa bir plazma yarı ömrü olmuştur. Proteinlerin amino gruplarının izosiyamik asit ile tepkimesi anlamına gelen carbamilasyon işlemi ile elde edilen CEPO ise EpoR'ye bağlanmamış ve yapılan farklı çalışmalarla doku koruyucu etkisinin olduğu iddia edilmiştir. EPO'nun B helix aköz bölgesinin taklit edilmesi ile elde edilen 11 amino asit yapılı helix B-surface peptid (HBSP), CEPO gibi reseptörlere seçici bağlanmış ve doku koruyucu etki göstermiştir (M. Brines, Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q., Smart, J., Su-Rick, C., Pobre, E., Diaz, D., Gomez, D., Hand, C., Coleman, T., Cerami, A. , 2004; Leist, 2004; Roxborough, 1995; Stamatou, 2003; Ueba, 2010).

Kronik böbrek hastalığı (CKD) gibi uzun süren böbrek hastalıklarında görülen anemi tedavisi için rekombinant teknoloji ile geliştirilen pek çok Epo Biyobenzeri (rekombinant human erythropoietin; rhEpo, Epoetin) ilaç bulunmaktadır. Bugün için pek çok farklı ticari isim altında epoetinler klinik uygulamalar için lisanslandırılmıştır. Farklı hücre grupları tarafından ve

farklı metodlarla üretilen epoetinlerin yapısı da farklı olmaktadır ve bu yapılara göre latince harfler sonlarına getirilerek; epoetin- α , epoetin-beta, epoetin-kappa gibi isimlendirilmektedir. Epoetinlerin yüksek masraflı üretimleri, kısa yarı ömürleri ve parenteral uygulanma zorunluluğu bu ilaçların olumsuz özellikleridir. Bununla birlikte daha uzun yarı ömürlü dolayısıyla daha az uygulanma gerektiren rhEpo'lar günümüzde kullanılmaktadır. Methoksi-poliyetlin glikol-epoetin beta'nın yarı ömrü 120-130 saatler arasındadır. Ülkemizde de CKD hastalarında çok yoğun kullanılan ve rhEpo'nun hiperglikoze bir mutanıtı olan Darbepoetin- α 'nın (Depo) ise deri altı enjeksiyondan sonra 70-105 saattir. Depo'nun 2 haftada 1 veya ayda 1 uygulanması CKD hastalığındaki aneminin tedavisi için yeterli olabilmektedir. Bununla birlikte yapılan pek çok çalışma Depo'nun sıçanlarda da etkin olduğunu göstermiş ve bu çalışmaları yapan araştırmacılar Epo gibi Depo'nunda doku koruyucu etkileri olduğunu öne sürmüşlerdir (Şekil 2.2) (Frenay, 2012; W. Jelkmann, 2014; MacDougall, 2007).



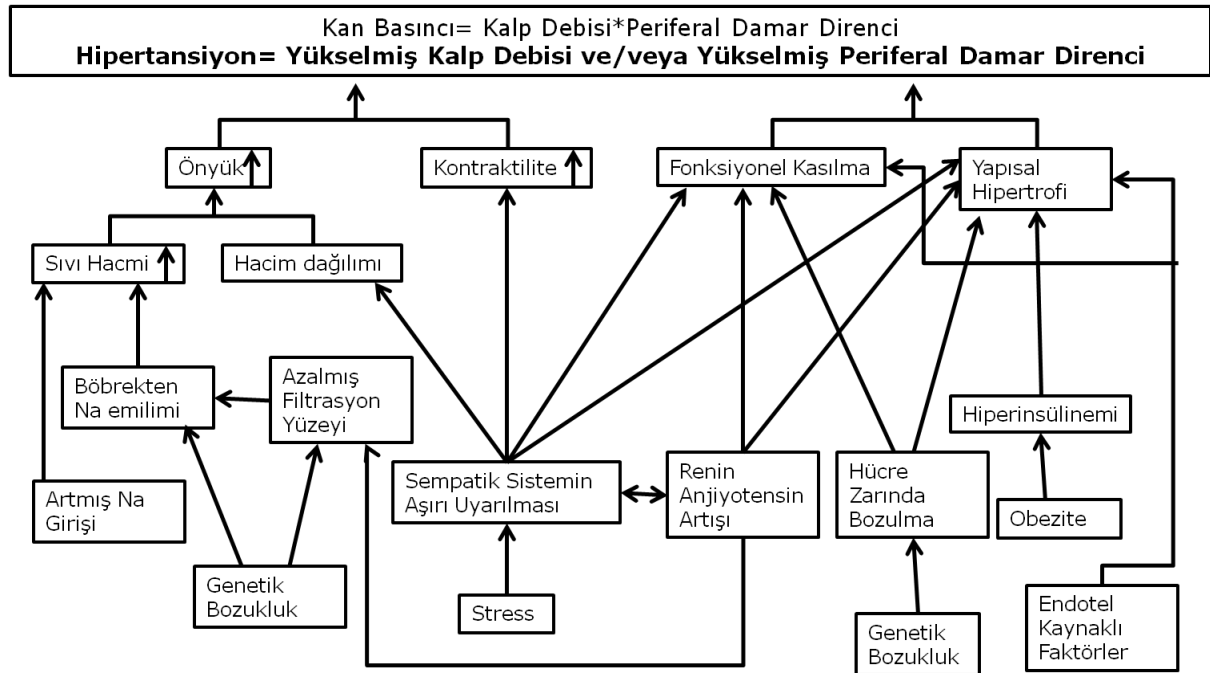
Şekil 2.2. Benzer ağırlıktaki insanlara verilen eşdeğer dozdaki Methoksi-poliyetlin glikol-epoetin beta, Depo ve Epoetin arasındaki plazma konsantrasyon karşılaştırması(W. Jelkmann, 2014).

2.2. Hipertansiyon

Hipertansiyon; istirahat halinde ortalama arter basıncının 110 mmHg'nin üstüne çıkması ya da sistolik kan basıncının 135-140 mmHg, diyastolik kan basıncının 90mmHg'nin üzerinde olması durumunun kronik olarak seyretmesi olarak tanımlanmaktadır. Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü'ne göre sistolik kan basıncı 120 mmHg'nin altında normal, 120-139 mmHg arası prehipertansiyon, 140-159 mmHg arası birinci basamak hipertansiyon ve 160 mmHg üzeri ise ikinci basamak hipertansiyon olarak sınıflandırılmaktadır. Buna ilaveten, hipertansiyon primer (esansiyel) ve sekonder olarak da sınıflandırılmaktadır. Sekonder hipertansiyon böbrek hastalığı, adrenal tümör, ilaç tedavisi veya diyabet gibi birincil bir neden sonucu ortaya çıkan hipertansiyondur. Esansiyel hipertansiyon ise yukarıda sayılan hastalıklar gibi bir nedene bağlı olmadan ortaya çıkan hipertansiyondur. Esansiyel hipertansiyon, tüm hipertansiyon vakalarının

%95'ini oluşturmaktadır (Carretero, 2000; Guyton, 2007; "http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hbp/," ; Mullins, 2006; Widmaier, 2014).

Genellikle esansiyel hipertansiyonun nedenleri tam olarak açıklanamamış gibi gözükse de oluşumunda rol oynayan pek çok faktör hakkında çeşitli bilgiler vardır. Esansiyel hipertansiyonun gelişimine katıldığını bildiğimiz patofizyolojik faktörler; yoğun fiziksel stres kaynaklı artmış sempatik sinir sistemi aktivitesi; vazokonstrüktör ve sodyum geri emilimini artırıcı hormonların yoğun salınımı; potasyum ve kalsiyumun diyetle yetersiz alınımı; yüksek ya da kontrolsüz renin salınımına bağlı artan angiotensin II ve aldosteron üretimi; natriüretik peptit, nitrik oksit ve prostasiklin gibi vazodilatörlerin eksikliği, vasküler tonüs ve böbreklerden tuz alımını etkileyen kallikrein-kinin sistemi ifadenemesindeki değişiklikler; direnç damarlarındaki anormallikler; diabetes mellitus; insülin direnci; obezite; vasküler büyüme faktörlerinin aktivitelerinde artış; kalp hızını, kalbin inotropik bileşimini ve vasküler tonusunu artıran adrenerjik reseptörlerdeki değişikliklerdir (Şekil 2.1.) (Oparil, 2003).



Şekil 2.3. Hipertansiyonun patogenezi.

2.2.1. Hipertansiyon Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan yöntemler günümüzde yaşam koşullarını değiştirmenin (sigara alışkanlığını bırakma, obeziteden kurtulma, düşük tuz diyetleri...) yanı sıra farmakolojik tedavi yöntemleriyle kan basıncını belirli sınırlar altında tutmaya yöneliktir. Kullanılan bazı ilaç grupları aşağıda tablo olarak verilmiştir;

Tablo 2.1. Antihipertansif ilaçların sınıflandırılması(Büyüköztürk, 1999)

Antihipertansif ilaçların sınıflandırılması		
a) Diüretikler		
b) Adrenerjik sinir sistemi antagonistleri		
I. Merkezi etkililer	II. Periferik etkililer	III. Adrenerjik reseptör blokerleri
	Adrenerjik nöron blokerleri	α reseptör blokerleri
	Ganglion blokerleri	β reseptör blokerleri
c) Renin-angiotensin sistemini etkileyen ilaçlar		
I. ACE inhibitörleri	II. Angiotensin II tip 1 reseptör antagonistleri	
d) Damar düz kasında etkili ilaçlar		
I. Kalsiyum kanal blokerleri	II. Potasyum kanal açıcılar	III. Doğrudan damar düz kasını gevşetici ilaçlar
e) Yeni geliştirilmekte olan ilaçlar		
I. Nötral endopeptidaz peptid(NEP) inhibitörleri	II. Endotelin reseptör antagonistleri	III. Renin inhibitörleri ve diğerleri

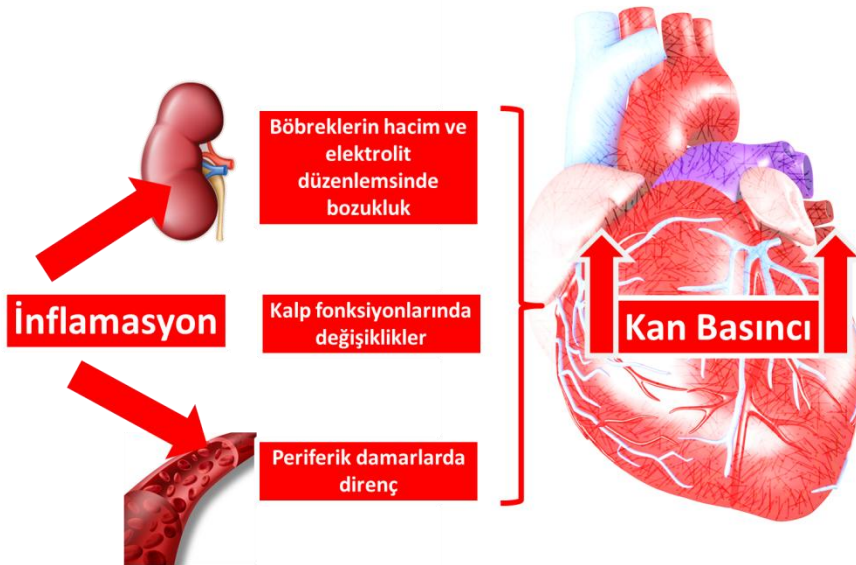
Hipertansiyon tedavisinde kullanılan bu ilaçların kan basıncını düşürme özelliklerinin yanında pek çok yan etkileri de mevcuttur. Diüretik tedavisinin vücut elektrolit dengesi ve potasyum metabolizması üzerine olan bozucu etkisi, beta blokörlerin kalbin işlevsel parametreleri üzerine ve bununla birlikte sinir ve solunum sistemleri, lipid ve karbonhidrat metabolizmaları üzerine olan etkileri, kalsiyum kanal blokörlerinin baş ağrısı, yüzde kızarıklık, baş dönmesi, sıcaklık basması, göz ağrısı, kulak çınlaması, ileti bozuklukları, bradikardi, ayak bileği ödemi, hipotansiyon, sedasyon, diş eti hipertrofisi, bazı cilt döküntüleri gibi etkileri bildirilmiştir (Büyüköztürk, 1999).

Her ne kadar hipertansiyon tedavisine ülkeler çok büyük kaynaklar ayırsa ve bu konuda halen çok yoğun bilimsel çalışmalar yapılıyor olsa da hipertansiyon hastalarının kan basınçları halen tamamen kontrol altına alınmış değildir. 35-64 yaş arası hipertansiyon hastalarının ABD'de %66'sı Kanada'da %49'u, Avrupa'da ise %23-38'i 160/95 mmHg değerlerinde kontrol edilebilmektedir. 140/90 eşliğinde ise hipertansiyon hastalarının ABD'de %29, Kanada'da %17 ve Avrupa'da %10'dan düşük bir kesimi kontrol edilebilmektedir (Wolf-Maier, 2004).

Yukarıdaki bulgular göstermektedir ki; hipertansiyon hastaları, medikal tedavi altında olsalar bile kullandıkları ilaçların yan etkilerine maruz kalmakta, yine de hastaların önemli bir bölümü kontrol edilememekte, yani vücutları kronik yüksek kan basıncının pek çoğu ölümcül ağır doku hasarlarına maruz kalmaktadır.

2.2.2. Hipertansiyon ve İnflamasyon

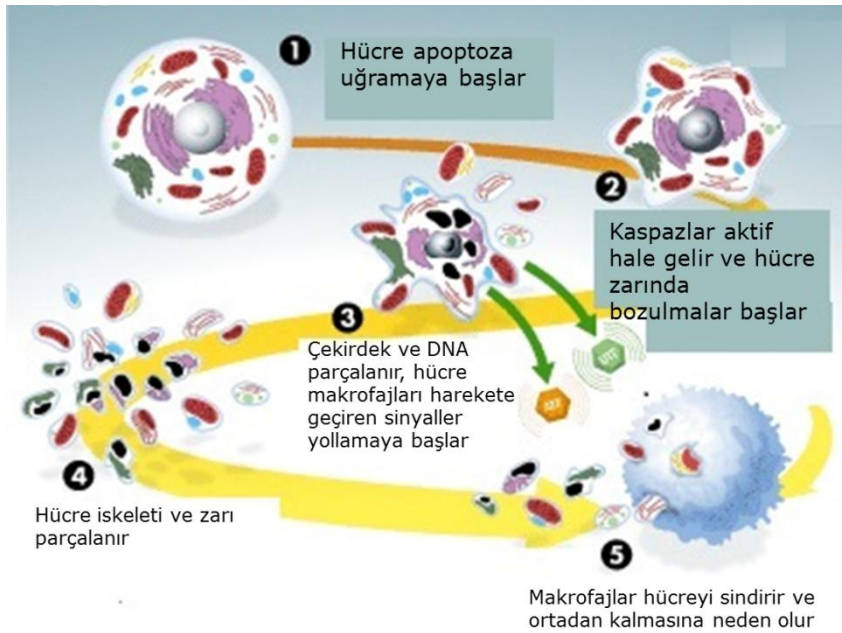
Esansiyel hipertansiyon, her ne kadar yukarıda sayılan nedenlerle ilişkilendirilse de son yıllarda yapılan çalışmalar lokal ve sistemik inflamasyon yanıtlarının hipertansiyonun gelişmesinde ve derinleşmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. İnflamasyon, kalp fonksiyonlarında değişikliklere, periferik damarlarda direnç gelişmesine ve böbreklerin plazma elektrolit ve hacim düzenlemesinde bozukluklara sebep olabilmektedir. Hipertansiyon gelişimi için en önemli organ sayılan böbreklerde ise renal vazokonstriksiyon ve iskemi oluşturabilmektedir. Yapılan deneysel bir çalışmada, hipertansiyonlu hastaların kanlarından izole edilen monositlerin lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılması sonucu sağlıklı bireylerin monositlerine göre çok daha yoğun İnterleukin-1 β ve daha da yoğun olmak üzere TNF- α sentezlendiği görülmüştür. Navarro-Gonzalez J.F. ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise yeni teşhis konmuş hipertansiyonlu ve sol ventrikülünde hipertrofi olan hastaların idrarlarında TNF- α 'nın artmış olduğu görülmüş ve hipertansiyonda TNF- α 'nın böbreklerde yoğun olarak üretildiği yorumu yapılmıştır. Başka bir çalışmada ise hipertansiyonlu hastalar kalp, böbrek ve damar duvarı gibi organ hasar veya hasarlarına göre gruplandırılmış, interleukin-6, sTNF-R1 ve sTNF-R2 organ hasarı olmayan hastalara göre organ hasarı sayısına da bağlı olarak artış göstermişlerdir. Henüz esansiyel hipertansiyonu kalıcı olarak tedavi etmekten uzak olursa da hipertansiyonla birlikte gelişen inflamasyonun etkilerinin önüne geçilebileceğini bildiren bazı çalışmalar bildirilmiştir (Şekil 2.2.) (Dörffel, 1999; Montecucco, 2011; Morillas, 2012; Navarro-Gonzales, 2008)



Şekil 2.4. Kalp böbrek ve periferik damarlar üzerine inflamasyon etkileri ile kan basıncının yükselmesi (orijinal çizim)

2.2.3. Hipertansiyon ve Apoptozis

Antik Yunanca'da sonbaharda düşen yapraklara yapılan bir benzetmeyle düşmek anlamında kullanılan apoptozis terimi, programlanmış hücre ölümünü ifade etmek üzere 1970'li yıllarda kullanılmaya başlanmış ve günümüze kadar fizyolojik ve patolojik mekanizmaların açıklanması konusunda pek çok yeni yaklaşımlar sunmuştur. Apoptozis; birinci aşamasında hücre içinde inaktif form olan prokaspaz halinde bulunan kaspazların aktive olmasıyla başlayan, şelale düzeni şeklinde çalışan proteolitik aktiviteler hücrenin küçülüp yoğunlaşmasına, DNA'nın ve hücre iskeletinin parçalanmasına ve hücre yüzeyinin bozulmasına neden olur. İkinci aşamasında ise makrofajlar apoptoz olan hücrenin zarına tutunarak hücreyi sindirir ve apoptotik hücrenin ortadan kalkmasına neden olur (Guyton, 2007; Han, 2013; Hung, 1997).



Şekil 2.5. Apoptoz mekanizması(Edmonds, 2010)

Apoptozis fizyolojik olarak, örneğin bağırsak epitellerinin yenilenmesi sırasında sürekli gerçekleşmesine rağmen hipertansiyon gibi hastalıklarda da patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Hipertansiyon modellerinde yapılan deneylerde, kalp, böbrek ve beyinde apoptozun gerçekleştiği gözlenmiş ve bunun damar endotel hücrelerinde nekroza göre daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Yine çeşitli çalışmalar, TNF- α 'nın apoptozu başlatan önemli sitokinlerden biri olduğunu göstermiştir (Gobe, 1997; Pavel, 1995; C. Y. Wang, Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, A.S., 1998).

2.2.4. Deneysel Hipertansiyon Modelleri

Hastalıklar üzerine yapılan bilimsel çalışmalarda deney hayvanları üzerinde çeşitli yollarla bu hastalıkları oluşturma ve deney hayvan modelleri üzerinde hastalıklara yeni tedaviler bulmaya çalışmak çok eski zamanlardan beri bilim adamlarının başvurduğu bir yöntemdir. Hipertansiyon çalışmalarında da pek çok avantajlarından dolayı özellikle sıçan ve fare üzerinde oluşturulan modeller sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar:

1. Goldblatt metodu: bu metod üç farklı yolla yapılabilir;

İki böbrek bir klip: böbreklerden birinin renal arteri bir klip aracılığıyla daraltılır, artan renin-anjiyotensin aktivitesine bağlı hipertansiyon gelişir.

Bir böbrek bir klip: böbreklerden biri çıkarılırken diğerinin renal arterine klip takılıdır, artan kan hacmi nedeniyle birkaç saat içinde hipertansiyon gelişir.

İki böbrek iki klip: aorta ya da her iki renal arter klip ile daraltılır, artan renin-anjiyotensin aktivitesine bağlı hipertansiyon gelişir.

2. Kâğıt yöntemi: bir selofan kâğıdı böbreğin etrafına sarılır ve ipek iplikle böbreğe sıkıca bağlanır. 3-5 gün içerisinde böbreğin etrafındaki selofan kâğıda karşı oluşan fibrokollajen doku böbrek parenkimine baskı yaparak böbrek damar basıncını düşürür ve ekstraselüler sıvı hacminin artmasına, dolayısıyla kan basıncının yükselmesine neden olur.

3. Grollman yöntemi: böbreklerden birini çıkararak ya da çıkarmayarak diğerine bir ip ile sekiz şeklinde düğüm atılmasıyla gerçekleşir.

4. Aortanın daraltılması yöntemi: abdominal aortanın, renal arterlerin hemen yukarisından ya da renal arterlerin arasından bir lastik bant ile daraltılması yoluyla böbrek kan akımının azaltılması sonucu hipertansiyon gerçekleşir.

5. Diyet yoluyla hipertansiyon: içme suyuna % 1-2 tuz eklenmesi sonucu 9-12 ay içerisinde hipertansiyon gelişir.

6. Mineralokortikoid kaynaklı hipertansiyon: Aldesteronun prekürsörü olan deoksikortikosterone (DOCA) aldesteron'a benzer mekanizmalarla, vazopressin salınımını artırarak

böreklerden tuz su emilimini artırır, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini (RAAS) bozarak sempatik aktiviteyi de artırır ve bu yolla hipertansiyon gelişir.

7. Psikojenik hipertansiyon: iki hafta boyunca günlük 20 dakika ya da 120 dakika jet uçağı simülasyonu ile oluşturulan gürültü stresine maruz kalan sıçanlarda hipertansiyon geliştiğı gözlenmiştir.
8. Genetik hipertansiyon: spontan hipertansif sıçanlar olarak da adlandırılan bu sıçanlar hiçbir cerrahi, farmakolojik veya fizyolojik etkiye ihtiyaç duymadan hipertansiftirler ve bunu genetik olarak alt kuşaklara aktarırlar.
9. Obezite kaynaklı hipertansiyon: obez Zucker sıçanları ile Wistar Kyoto sıçanlarının çaprazlaması (melezlenmesi) ile oluşan Wistar Fatty sıçanlarında doğumdan sonraki 16. haftada hiperinsülinemi ve hipertansiyon gelişir.
10. Kolinomimetik ilaçlarla hipertansiyon: bir kolinesteraz inhibitörü olan physostigmine (10-80 µg/kg, iv) veya muskarinik kolinerjik agonist olan oksotremorine (20-40 µg/kg, iv) doza bağımlı olarak hipertansiyona sebep olur. Kolinomimetik ilaçlarla gelişen hipertansiyonun, kolinerjik mekanizma ve periferik sempatik sistem aktivitesi tarafından oluşturulduğı tespit edilmiştir.
11. Anjiyotensin-II kaynaklı hipertansiyon: anjiyotensin-II'nin (0,7 mg/kg/gün) bir mini pompa aracılığıyla derialtı infüzyonu, dört-sekiz hafta arasında hipertansiyona sebep olur.
12. NO sentezinin kronik inhibisyonu yolu ile hipertansiyon: damar düz kaslarında gevşemeyi sağlayan önemli bir vazodilatör olan NO'nun sentezlenmesini nitrik oksit sentaz (NOS) sağlar. Bu enzim L-arjinin amino asidini deaminize ederek NO'yu sentezler. L-arjinin analogu olan N^ω-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N-iminoetil-L-ornitin ve N^ω-nitro -L-arjinin metil ester (L-NAME) L-arjinin ile yarışa girerek NO sentezini baskılar ve hipertansiyon gelişimine neden olur.

Hipertansiyon model çalışmaları için geçmişte kedi ve köpek kullanılmış olsa da günümüzde daha çok sıçan ve bunun yanı sıra fare de kullanılmaktadır. Sıçan modelleri içinde, gelişen genetik teknoloji ile spontan hipertansif sıçanlar özellikle doksanlı yıllarda çok daha yoğun kullanılmaya başlanmıştır. Spontan hipertansif sıçanlarda gelişen kardiyak hipertrofi, böbrek ve kalp yetmezliğı gibi sorunlar bu modelin

dezavantajlarıdır. Yine çok sık kullanılan DOCA ve tuz diyeti yöntemi de kardiyak hipertrofi ve renal yetmezliğe neden olmaktadır. Cerrahi yöntemlerle yapılan hipertansiyon modelleri, bizim çalışmamızda olduğu gibi böbrek dokusuna odaklanan çalışmalar için uygun değildir. L-NAME ile oluşturulan hipertansiyon modelinde ise yukarıda bahsedilen kalp ve böbrek yan etkileri henüz literatüre geçmediğinden, böbreğe doğrudan bir etkide bulunmadığından ve de uygulanması kolay olduğundan çalışmamızda tercih ettiğimiz bir yöntem olmuştur (Badyal, 2003; Hacıoğlu, 2002; Johns, 1996; Kaur, 2011; Pinto, 1998).

2.2.5. Hipertansiyon modelinde kullandığımız SD sıçanların fizyolojik değerleri

Yetişkin dişi SD cinsi sıçanların fizyolojik parametreleri için referans oluşturmak üzere yapılan farklı çalışmalar literatürde ve SD sıçan üretimi yapan büyük firmaların kataloglarında mevcuttur. Bu çalışmaların sunduğu veriler aşağıda tablo olarak derlenmiştir (Aleman, 1998; "Hsd: Sprague Dawley," 2008; Probst, 2006; "Sprague Dawley Rat,").

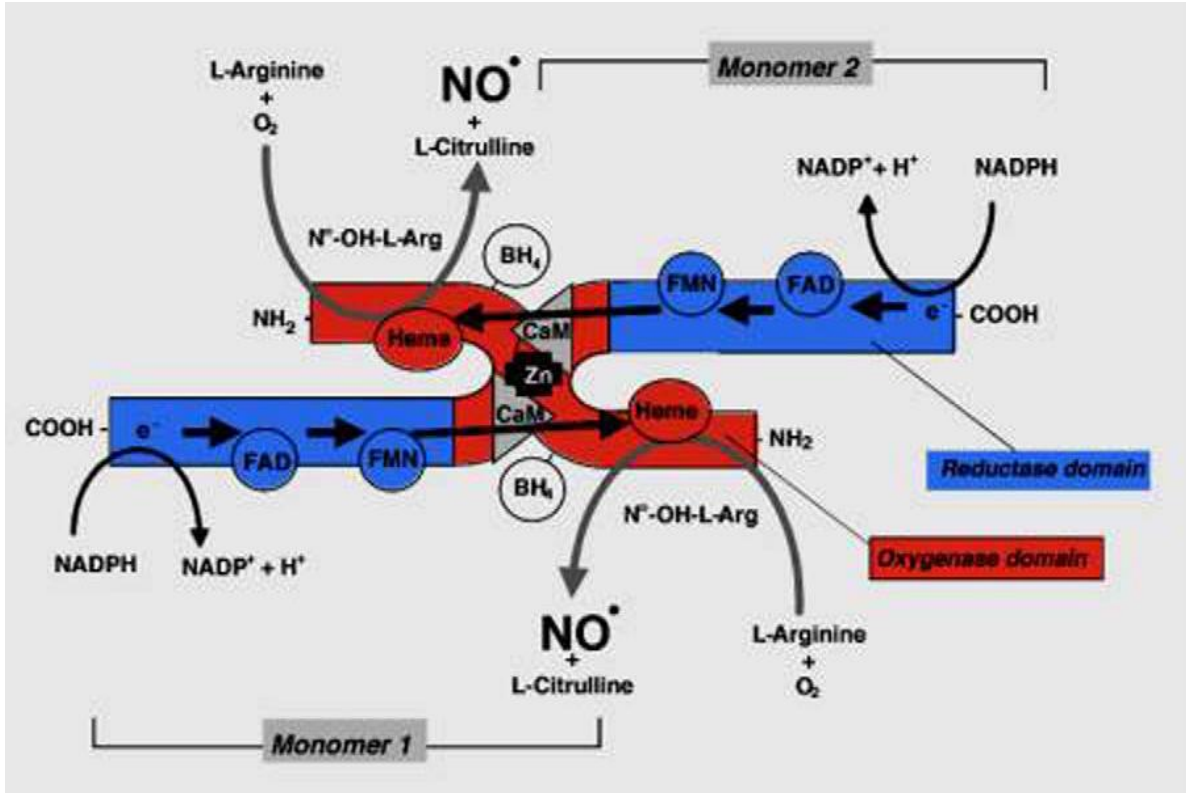
Tablo 2.2. SD sıçanların fizyolojik değerleri

Aleman C.L. ve arkadaşları			
Ortalama ağırlık 13. hafta	200-350 gr	Hematokrit	43.79±2.35 %
Hemoglobin	13.67±1.27 g/100ml	Sağ böbrek ağırlığı Toplam vücut ağırlığına göre %	0.35±0.03 %
Probst R.J. ve arkadaşları			
Ortalama ağırlık 11 haftalık	244 ± 21 g	Hematokrit	~38%
Harlan Lab. Inc. ABD			
Ortalama ağırlık 1-11 hafta arası	37,5-212,6 gr		
Taconic Biosciences ABD			
Alyuvar	7.7 ±0.3X10 ⁶ /uL	Akyuvar	6.0 ±1.5x10 ³ /uL
Hemoglobin	16.1 ± 0.6 gr/dl	Sağ böbrek ağırlığı	0.85 ± 0.08 gr
Hematokrit	51.2 ± 2.6 %	Ağırlık 8. hafta	209.71 gr
MCH	21.0 ± 1.1pG	Ağırlık 10. hafta	241.11 gr

2.3. Nitrik Oksit

Küçük, radikal gaz molekülü olan NO'nun damar tonusunu düzenlemek, merkezi ve periferik sinir sisteminde nörotransmitter olarak çalışmak ve bağışıklık sisteminde rol oynamak gibi pek çok önemli fizyolojik görevleri bulunmaktadır. Beyinde, beyine özel cNOS'ların uyarısı ile sentezlenen NO'nun hafıza ve öğrenmede önemli rol oynayan bir nörotransmitter olduğu düşünülmektedir. Damar endotel hücrelerinde

eNOS tarafından sentezlenen NO ise damarların gevşemesini ve proliferasyonunu sağlamaktadır. Dokularda görülen hipoksizde de NO bu özelliğiyle görev almaktadır. Makrofaj kaynaklı NO'nun antiinflamatuvar etkisinin yanı sıra iNOS tarafından sentezlenen NO, mitokondriyel solunumu baskılar ve serbest oksijen atomlarıyla yaptığı tepkime sonucu etkili bir oksidan ajan olan peroksinitritin oluşmasına neden olur, böylece doku hasarında rol oynar. (Calapai, 2000; Moncada, 2006; C. Nathan, 1992; C. Nathan, Xie, Q., 1994; Pacher, 2007; X. Q. Wang, Vaziri, N.D., 1999)



Şekil 2.6. L-argininden NOS enzimi ile NO sentezi(Kleinert, 2007).

2.3.1. NO Sentezinin fizyolojik düzenlenmesi

Sinir hücrelerinde sentezlenen nNOS ve endotel hücrelerinden sentezlenen eNOS, temel olarak makrofajlardan sentezlenen iNOS'a göre daha fazla kalsiyum- kalmodulin (CaM) bağımlı enzimlerdir. Hücre membranına bağlı durumdaki eNOS ve iNOS kalsiyumun hücre içindeki konsantrasyonunun yükselmesiyle aktif hale gelir. CaM varlığı NADPH üzerinden enzimatik reaksiyonu hızlandırır. iNOS proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α , interferon- γ (INF- γ) ve interleukin-1 β 'ya (IL-1 β) bağımlıdır ve iNOS'un sitoplazmada tespit edilebilir düzeyde ortaya çıkması ancak bu sitokinlerin uyarısı ile oluşmaktadır. iNOS tarafından üretilen NO çok hızlı bir şekilde nanomolar hatta mikromolar düzeyine çıkar ki bu miktar diğer NOS'lar tarafından sentezlenen NO'ya göre çok yüksek bir miktardır. Sentezlenen NO'nun NOS'larda bulunan Heme

bölgesine bağlanması NOS aktivitesini durduran bir geri bildirim mekanizmasıdır (Kleinert, 2007; C. Nathan, Xie, Q., 1994).

2.3.2. L-NAME'in NO Blokajı Yöntemi ile Oluşturulan Hipertansiyon Modeli

Sıçanlarda NO'nun L-NAME ile kronik inhibisyonu yoluyla oluşturulan hipertansiyon literatürde çok sık kullanılan deneysel hipertansiyon modellerinden biridir. Chao-Yu M. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, ortalama 307 gr olan SD sıçanlarının, içme suyuna 1gr/kg dozunda ilave edilen L-NAME, ağırlık kaybına, 2. hafta itibariyle sıçanlarda hipertansiyona neden olmuş ve bu hipertansiyon 3. ve 4. haftalarda ilerleyerek gelişmiştir. Aynı çalışmada kan basıncı dalgalanmasına bakılmış ve L-NAME verilen sıçanların kontrole göre daha çok değişkenlik gösterdiği ayrıca L-NAME verilen sıçanların plazma NO düzeylerinin anlamlı derecede düştüğü gözlenmiştir. Tanır, H.M. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada L-NAME'nin 50 mg/kg ip uygulanması ile dişi sıçanlarda pre-eklampsiya modeli oluşturulmuş ve 18. günden itibaren hipertansiyon gözlenmiştir. Ayrıca bu sıçanlarda gelişen oksidatif hasara karşı SOD ve MDA gibi antioksidanlar yükselmiş ve proteinüri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Paulis, L. ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise 5 hafta boyunca verilen 40mg/kg dozundaki L-NAME'nin etkilerini L-NAME vermeyi kestikten sonraki 3 hafta daha takip edilmiştir. Burada yükselen kan basıncının başlangıçtan itibaren 8. haftaya doğru hafif bir düşüş göstermesine rağmen hipertansif sınırlar içerisinde kaldığı gösterilmiştir (Paulis, 2008; Tanır, 2005).

L-NAME ile oluşturulan hipertansiyon modeli yukarıda belirtilen özelliklerinden dolayı hipertansiyonun organ hasarına odaklanan kronik çalışmalar için tercih edilen bir modeldir.

2.4. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)

1893 yılında Dr. B. Coley, bir hastasının dizinde oluşan ameliyata uygun olmayan sarkoma tümörünün, peş peşe gelen iki erisipela (yılancık) atağı ile iyileştiğini görmüştür. Bunun sebebi olarak erisipela hastalığının sebebi olan streptokokların sarkomayı tedavi edici bir madde salgıladıkları öne sürmüştür. Daha sonra 1962 yılında LPS ile uyarılmış fare serumunun, tümörlerde hemorajik nekroze sebep olduğunu belirtmiş ve benzer çalışmalarla bu fenomen desteklenince o yıllarda henüz izole edilememiş olan proteinin adı bu fenomen üzerinden konulmuştur: tümör nekroz faktör (TNF- α). İlk defa 1984'te izole edilen TNF- α kısa sürede yüzlerce makalenin konusu olan ve bugün halen üzerinde yoğun çalışılan bir proteindir. Bunun temel sebebi; inflamasyon, kaşeksi, septik şok ve doku yaralanmasında öncü rolünün yanı sıra halen araştırılmakta olan pek çok fonksiyonudur. TNF- α bulunduğu ortamdaki konsantrasyonu, dokudaki

lokalizasyonu, TNF- α 'ya bağlanan proteinlerin lokal aktivitesi, hormonal ortam gibi faktörlere bağlı olarak yararlı ya da zararlı etkiler gösterebilmektedir. Lipopolisakkaritler (LPS) gibi bakteriyel uyarılar ya da romatoid artrit gibi hastalıklarda harekete geçen TNF- α , immun yanıtın oluşmasında önemli görevler almaktadır. Kandaki TNF- α miktarı aşırı yükseldiğinde ise septik şok, çoklu organ hasarı ve ölüm gibi etkiler göstermektedir (Bemelmans, 1996; Tracey, 1993).

2.4.1. TNF- α Sentezi

En fazla makrofajlardan olmak üzere, T-lenfositlerden, NK-hücrelerinden, Kupfer hücrelerinden, düz kas, sinir, endotelyal ve bazı tümör hücrelerinden sentezlenmektedir. Sentezlenmesinin en güçlü uyarıcı gram negatif bakterilerin hücre membranında bulunan LPS'dir. Ayrıca TNF- α 'nın kendisi, bazı interleukinler, immun kompleksler, C5a, virüsler ve iskemi reperfüzyon hasarı TNF- α 'nın sentezini uyarabilmektedir (Bemelmans, 1996; Tracey, 1993).

TNF- α geni 6. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. TNF- α pro-hormon şeklinde 233 amino asit olarak sentezlenir ve daha sonra 76 amino asitten oluşan artık bir parçanın uzaklaşmasıyla 17 kDa ağırlığındaki olgun protein ortaya çıkar (Bemelmans, 1996; Tracey, 1993).

2.4.2. TNF- α Reseptörleri

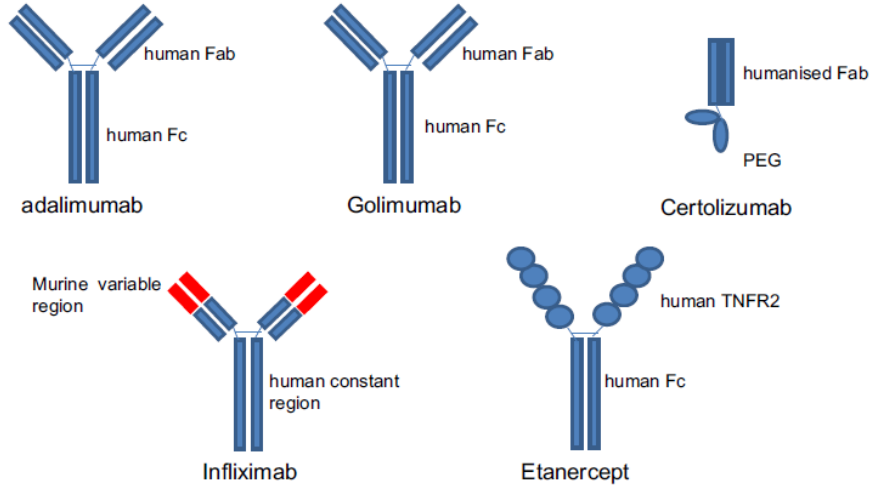
TNF- α 55 kDa ağırlığında (TNFR1) ve 75 kDa ağırlığında (TNFR2) olmak üzere iki reseptör aracılığıyla fonksiyonlarını yerine getirmektedir. Her ne kadar TNFR2'nin TNF- α 'ya bağlanma afinitesi daha yüksek olsa da TNFR1'in TNF- α fonksiyonlarında daha baskın rol aldığı düşünülmektedir. TNFR1 uyarılınca hücre içinde proteinkinazC, fosfolipaz A2, sfingomiyelinaz ve fosfatidilkoline özel fosfolipaz C aracılığıyla fonksiyonunu yerine getirmektedir (Bemelmans, 1996; Hierro, 2012; Medvedev, 1996; Puimege, 2014; Tracey, 1993)

TNF- α 'nın karmaşık görevlerini nasıl yerine getirdiği konusundaki en önemli olasılık; iki ayrı reseptörün hücre içinde farklı yolları kullanarak farklı sonuçlar ortaya çıkmalarıdır. TNFR1, apoptozis signal-regulating kinase (ASK) ve c-Jun N-terminal kinase (JNK) aktivasyonu ile apoptozise, TNFR2 ise epitelyal tirozin kinazı uyararak hücre proliferasyonuna neden olur (Kishore, 2011).

2.4.3 Anti-TNF Tedavisi

Romatizmal artrit hastalığının tedavisinde günümüzde kullanılan 5 ayrı TNF- α antikoru bulunmaktadır (Şekil 2.3.). Bu antikorlardan infliximab ilk sentezlenen ve en yaygın kullanılanıdır. İnfliximab, insan sabit bölge ve kemirgen değişken bölgenin (murine variable region) bileşiminden oluşur.

Bunun dışında diğer antikordardan golimumab ve adalimumab rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen tam insan antikordur. Etanercept ise insan immunoglobulin 1'in Fc parçası ile iki TNFR2'nin bileşiminden oluşan bir füzyon proteindir. Certolizumab, insanlaştırılmış Fab ve polietilenglikol'den oluşur. Yapılan araştırmalar bu 5 ayrı antikor arasında klinik etkinlik ya da yan etkiler konusunda herhangi bir major fark göstermemiş olsa da infliximab'ın etanercept alan hastalara göre tedavilerinin daha kısa sürdüğü, infliximabın etanerceptten iki kat daha immunojenik olduğu bilinmektedir (Şekil 2.3.) (Thalayasingam, 2011).



Şekil 2.7. TNF- α antikoru (Thalayasingam, 2011)

2.4.4. İnfliximab'ın Deney Hayvanlarında Kullanımı

Her ne kadar insan TNF- α ile kemirgen TNF- α %71-%92 arasında homoloji gösterse de yukarıda sayılan antikoru deney hayvanlarında kullanımı konusunda literatürde infliximab kullanımı diğerlerine göre çok yaygın görülmektedir. Bunun temel sebebi; infliximabın diğer antikordardan farklı olarak kemirgen değişken bölgesinin olması ve bu antikoru deney hayvanlarında etkin olduğunu gösteren pek çok çalışmanın bulunmasıdır. Bu konuda Papaconstantinou I. ve arkadaşlarının sıçan bağırsak anastomoz çalışmasında infliximabın iyileştirici etkisinin gösterilmesi ile Filho A.G. ve arkadaşlarının yaptığı spontan hipertansif sıçan aortasında infliximabın AKT/eNOS yolağını kullanarak sistolik basıncı düşürdüğünü gösteren çalışma örnek olarak gösterilebilir. Bugün infliximab ticari olarak en çok Remicade (Rem) ismiyle kullanılmaktadır (Filho, 2013; Papaconstantinou, 2014).

2.5. EPO, TNF ve Hipertansiyon

Hipertansiyon ile ilgili pek çok çalışma yapılmasına rağmen kan basıncı halen kalıcı olarak fizyolojik sınırlara çekilememiştir. Bununla birlikte hipertansiyonda artan TNF- α 'nın blokajı özellikle böbreklerde oluşan doku hasarını önleyebilir. Yapılan çalışmalar, tartışmaları ortadan kaldırmaya da Epo'nun böbrek dokusunda koruyucu bir etkisinin olabileceğini göstermiştir. TNF'nin Epo üzerindeki baskılayıcı etkisi Epo'nun böbrek dokusu üzerindeki koruyucu etkisini de baskılıyor olabilir. Bu bilgiler ışığında, TNF'nin bir antikora baskılanması ve Epo'nun ekzojen olarak verilmesi hipertansiyonda oluşan böbrek hasarını önleyecek, hastaların yaşam kalitelerini artıracak ve hipertansiyonun derinleşmesini engelleyecektir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Deney Hayvanları

Deneylerde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezinde yetiştirilen 200-250 gr ağırlığında erişkin dişi Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar enjeksiyonların devam ettiği 30 gün boyunca Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezinde standart koşullarda, standart sıçan sanayi yemleri ve çeşme suyu ile ad libitum beslenmiştir. Tüm deney hayvanı çalışmaları Hayvan Etik Kurulu'nun izni (302-1 dosya kayıt ve karar numarası ile) alındıktan sonra saat 9.00-14.00 arasında gün ışığında Fizyoloji Anabilim Dalı in-vivo araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- a) Darbepoetin- α (Aranesp 50 μ gr AMGEN): 0,1, 0,25, 0,5, 2,5 ve 10 μ gr/kg/ml olacak şekilde SF içerisinde sulandırıldı.
- b) İnfliximab (Remicade 100 mg Schering-Plough Co.): 5 mg/kg/ml olacak şekilde SF içerisinde sulandırıldı.
- c) L-NAME (% \geq 98 powder SIGMA): 20 mg/kg/ml olacak şekilde SF içerisinde sulandırıldı.
- d) Ketamin (Ketalar 50 mg/ml Pfizer): 50 mg/kg dozunda ip olarak kullanıldı
- e) Xylazine (Rompun 25 ml BAYER): 10 mg/kg dozunda ip olarak kullanılmıştır.
- f) Heparin (SIGMA): 100 IU/ml olacak şekilde SF içerisinde sulandırıldı

3.1.2. Kullanılan Cerrahi Aletler

- a) Genel amaçlı cerrahi makas
- b) Damar makasları
- c) Eğri doku forsepsi
- d) Eğri iris forsepsi
- e) Sivri uçlu forsepsler
- f) Hemostatik forsepsler

3.1.3. Diğer Araç ve Gereçler

- a) Data Acquisition ve analiz sistemi (MP 100 Biopac, ABD)
- b) Otomatik kontrollü küçük hayvan operasyon masası 37 \pm 0,5 $^{\circ}$ C (Commat-Türkiye)
- c) Basınç Transdüseri (Biopac, ABD)
- d) İnfüzyon pompası (Commat, Türkiye)
- e) Polietilen PE 50 tip kanül
- f) Polietilen ip 5/0

g) Çeşitli ebatlarda enjektörler

3.1.4. Deney Protokolü

Deneyde 100 adet sıçan rastgele 10 gruba ayrıldı (n=10). Deney hayvanları ağırlıkları ölçülerek deneye alındı ve 30 günlük ip enjeksiyon periyotları başlatıldı. Gruplara göre enjeksiyon periyotları aşağıdaki gibidir:

Kontrol grubu (Kontrol): 30 gün boyunca günlük 1 ml/kg dozunda serum fizyolojik verildi

Sham grubu (L): 30 gün boyunca günlük 20 mg/kg dozunda L-NAME verildi

Depo 0,1 grubu (L+Depo0,1): 30 gün boyunca günlük 20 mg/kg dozunda L-NAME ile birlikte günlük 0,1 µgr/kg dozunda Depo verildi

Depo 0,25 grubu (L+Depo0,25-L+Depo): 30 gün boyunca günlük 20 mg/kg dozunda L-NAME ile birlikte 3 günde bir 0,25 µgr/kg dozunda Depo verildi

Depo 0,5 grubu (L+Depo0,5): 30 gün boyunca günlük 20 mg/kg dozunda L-NAME ile birlikte 3 günde bir 0,5 µgr/kg dozunda Depo verildi

Depo 2,5 grubu (L+Depo2,5): deney başlangıcından itibaren yaşam süreleri boyunca 20 mg/kg dozunda L-NAME ile birlikte 3 günde bir 2,5 µgr/kg dozunda Depo verildi

Depo 10 grubu (L+Depo10): deney başlangıcından itibaren yaşam süreleri boyunca 20 mg/kg dozunda L-NAME ile birlikte 3 günde bir 10 µgr/kg dozunda Depo verildi

Remicade grubu (L+Rem): 30 gün boyunca günlük 20 mg/kg dozunda L-NAME ile birlikte 3 günde bir 5mg/kg dozunda Rem verildi

Rem+Depo grubu (L+Depo+Rem): 30 gün boyunca günlük 20 mg/kg dozunda L-NAME ile birlikte 3 günde bir 0,25 µgr/kg dozunda Depo ve günlük 5 mg/kg dozunda İNF verildi

Depo 0,25 kontrol grubu (Depo): 30 gün boyunca 3 günde bir 0,25 µgr/kg dozunda Depo verildi.

Depo'nun sıçanlarda kronik kullanımı konusunda literatürde yeterli bilgi görülmediği için çalışmamızda farklı dozlar denedik. Bu dozlardan hematokrit seviyelerine etkide bulunmayan en yüksek doz olan 0.25 µg/kg dozu tedavi doz olarak L+Depo+Rem ve Depo gruplarında kullandık.

3.1.5. Anestezi ve Operasyona Hazırlık

Sıçanların 30 günlük enjeksiyon periyotları sonunda, ağırlıkları ölçülüp ip olarak 50 mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Xylazine karışımı anestezi için verildi. Anestezi derinliği enjeksiyondan 5 dk sonra göz refleksi ve "ağrılı stimulusa yanıt" (forsepsle sıçan ayağının sıkıştırılması) ile belirlenmiştir.

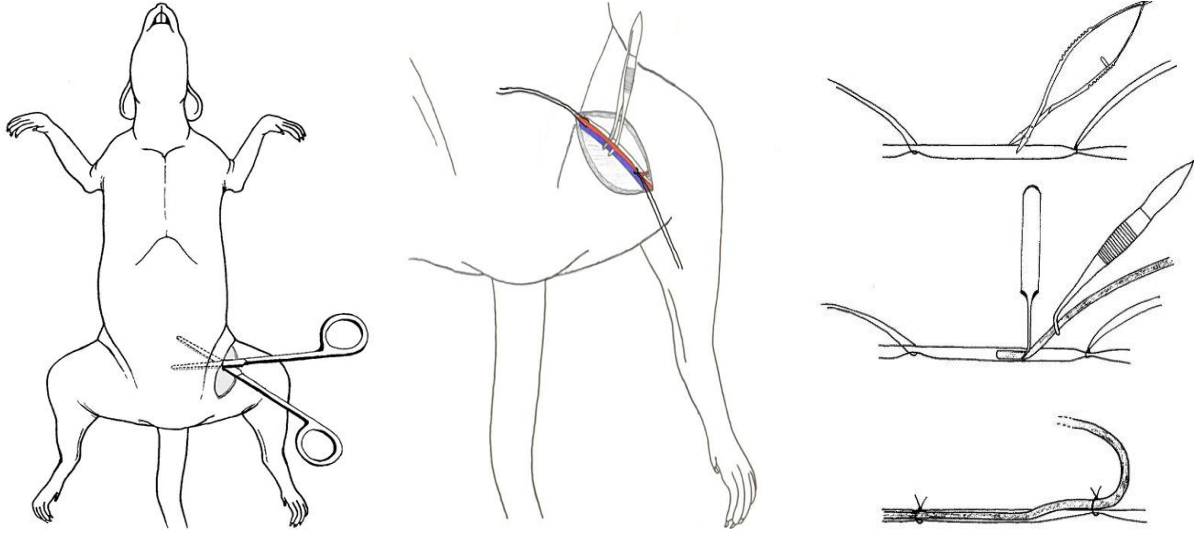
Anestezi edilen hayvanlar $37\pm 0,5$ °C ısı kontrollü operasyon masasına alınıp ekstremitelerinden birer flaster ile tespit edilip, dezenfektan madde (Betadin) ile işlem alanları temizlenmiştir. Kan alımı ve kan basınç takibi için sol femoral arter kateterizasyonu; sıvı infuzyonu (%0,85 NaCl, 50 ml/dk) için sol femoral ven kateterizasyonu (PE50 tip) yapılmıştır. Deneye giriş ve deney sonrası ağırlıkları kontrol edilerek tüm deney boyunca ekstraselüler kayıp olmadığı teyit edilmiştir.

3.1.6. Femoral Arter ve Ven Kateterizasyonu

Sol inguinal alanda küçük bir insizyon yapılarak künt diseksiyonla genişletilmiş ve deriyi ekstremiteler kaslarına yapıştıran bağ dokusu karın duvarına doğru forsepsin iki ucu ile açılarak ameliyat alanı tamamen ortaya çıkarılmıştır. Arter ve ven üzerindeki zar ince pensler yardımı ile uzaklaştırılıp, ikisi birbirinden izole edilmiştir. Uygun uzunlukta izole edilen arter ve ven etraflarından bir vücut bir de ekstremiteler tarafından olmak üzere ikiye 5/0 tip ip geçirilmiştir. Önce ven kateterizasyonu yapılacağı için venöz damar hafifçe gerilecek şekilde iki ip arasında forseps yardımı ile askıya alınmıştır. Bu şekilde vücut tarafındaki ip ile hemostatik etki uygulanmış ve damar üzerinde işlem kolaylaştırılmış olur. Damar üzerine yarısından fazla olmayacak şekilde küçük, eğik (45°) bir kesi yapılarak, çok ince bir forsepsle açık tutulabilecek bir çentik oluşturulup içi heparinli SF ile doldurulmuş PE-50 tip polietilen kanül 2-3 cm damar içine itilerek yerleştirilmiştir. Kanül damar üzerinden ip ile bağlanarak tespit edilmiştir. Kanın pıhtılaşmasını önlemek için kanülün serbest ucundan heparinli SF ile dolu enjektör yardımı ile 0,2 cc verilmiştir. Bundan sonra sol femoral arterin kateterizasyonu aynı yol izlenerek yapılmıştır.

Kateterizasyon operasyonunun bitmesini takip eden ilk 30 dk'lık stabilizasyon periyodunun ardından kan basıncı değerleri ölçüldü. Sistolik basınç, diyastolik basınç, ortalama arter basıncı, nabız basıncı ve kalp hızı ardı ardına 3 kez ölçülerek, bunların ortalaması değerlendirmeye alınmıştır.

Ölçümlerin hemen ardından içinde EDTA bulunan kan alma tüplerine 2 cc arteriyel kan alındı. Sağ böbrek tartılmak üzere çıkarıldı ve hızlıca tartıldı. Sol böbrek de çıkarıldı ve longitudinal hattan ikiye bölündü, yarısı histolojik değerlendirmeler için hızlıca formaldehit içerisine konulurken, diğer yarım RNA analizi için Tripure solüsyonunun içine konuldu, Tripure içindeki dokular izolasyon işlemine kadar -80°C'de saklandı.



Şekil 3.1. Femoral arter ve ven kateterizasyonu

3.2. Kan Parametrelerinin Ölçülmesi

Operasyon sonrasında EDTA'lı tüplere alınan kanlar 5 dakika boyunca karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra hayvan kan sayım cihazında total hemogram parametreleri (alyuvar, hematokrit, hemoglobin, MCH, akyuvar) yönünden analiz edildi (Abcus Junior Vet Blood Analysis System, Diatron, Macaristan).

3.3. Real-Time PCR Tekniği ile TNF- α , TNFR1, TNFR2 ve EpoR mRNA Miktarlarının Relatif Ölçülmesi

Böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan hedef mRNA'larımız olan TNF- α , TNFR1, TNFR2, EpoR mRNA'larının relatif rakamsal değerlerini tespit etmek için gerçek zamanlı reverse-transkriptaz PCR tekniği kullanıldı.

3.3.1 Total RNA İzolasyonu

Tripüre içinde saklanan dokulardan total RNA kloroform yöntemiyle izole edilmiştir. Yöntem şu şekildedir;

1. Doku örneği metal boncukların olduğu tüplere aktarıldı. Frekans 30 Herz olacak şekilde 4 dk homojenize edildi.
2. Boncuklar alındı ve örnek başka bir tüpe aktarılarak üzerine 200 μ l kloroform eklendi ve vortekslendi.
3. 12000 g'de ve +2 - +8°C 'de 15 dk santrifüj edildi.
4. 3 faz oluştu: Üst faz: RNA; Orta faz: DNA; Alt faz: Protein
5. Üstteki RNA fazı alındı.
6. Alınan RNA fazının üzerine 500 μ l izopropanol eklendi ve alt üst edildi (İzopropanol presipitasyon için kullanılır).
7. RNA presipitasyonu için oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.

8. 12000 g'de ve 2 - 8°C 'de 10 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldı ve pelet kaldı.
10. %75'lik ethanolden 1 ml eklendi. RNA peleti ethanol içinde vortekslenerek yıkandı.
11. 7500 g'de ve 2 - 8°C 'de 5 dk santrifüj edildi.
12. Süpernatant atıldı.
13. RNA peletinden ethanolü uzaklaştırmak için kurumaya bırakıldı.
14. RNA peletinin üzerine RNAaz free water eklendi.
15. RNA peleti birkaç kez pipetajla çözüldü.
16. 55°C'de 15 dak inkübe edildi.
17. Ependorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80°C'de saklandı.

3.3.2. Total mRNA'lardan cDNA sentezi

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla izole ettiğimiz total RNA'dan 1,5 µl Nanodrop kullanılarak (Thermo Scientific, USA) 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı. cDNA aşağıdaki yöntemle sentezlendi;

1. Total RNA (500 ng) + ddH₂O= 9,4 µl olacak şekilde karıştırıldı.
2. Üzerine 1 µl random primer, 1 µl oligo-dt eklendi. Total: 11.4 µl
3. 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.

Komponent hazırlandı:

Buffer 5x	: 4 µl
Reverse transkriptaz	: 1,1 µl
Protector RNAase inhibitör	: 0,5 µl
Deoksinükleotit mix	: 2 µl
DTT	: 1 µl

Total : 8.6 µl

4. 11,4'lük total üzerine 8,6 µl komponentten dağıtıldı ve vortekslendi.
5. cDNA sentezi için PCR şartları
29°C'de 10 dakika
48°C'de 60 dakika
85°C'de 5 dakika
6. Çıkan örnekler 2 - 8°C'de 1-2 saat; (-15) ila (-25) °C'de daha uzun süre saklandı.

3.3.3. Primer Dizilerinin Hazırlanması

TNF- α , TNFR1, TNFR2, EpoR (hedef genler) ve β -aktin (referans gen) primer dizileri Roche, Almanya tarafından dizayn edildi.

3.3.4. Real-Time PCR

TNF- α , TNFR1, TNFR2, EpoR ve β -aktin mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak Roche Nano Lightcycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile ölçüldü. RT-PCR için Tablo 3.1.'deki karışım hazırlanıp reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. RT PCR için karışım içeriği.

Karışım	Miktar (μ l)
Reconstituted primer /probe miks (TNF- α , TNFR1, TNFR2, EpoR ve β -aktin)	1
2X qPCR Mastermiks	10
PCR-Grade water	4
cDNA	5
Toplam	20

Toplam 20 μ l RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95° C'de	10 dk	} 50 döngü
95° C'de	20 sn	
55° C'de	30 sn	
72° C'de	20 sn	

Çalışmanın sonuçları LightCycler® Nano Software'den alınan ct değerleri ile $2^{-\Delta\Delta ct}$ relatif kuantifikasyon yöntemiyle değerlendirildi.

3.4. ELISA Yöntemi ile Kan Plazmasından TNF- α ve EPO miktarı Tayini

Arteriyel kandan ayırtırdığımız plazmalarda bulunan Epo ve TNF- α miktarlarının tayini için ELISA yönteminden yararlandık.

1. Sıçanlarda EDTA'lı tüpe alınan kanlar 4100 G devirde 15 dk santrifüj edildi, üst fazda kalan plazmalar bir pipet yardımıyla steril tüplere alındı ve deney tarihine kadar -20°C'de saklandı.
2. Deney günü plazmalar oda ısısında erimeleri beklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Epo tayini Eastbiopharm Rat Erythropoietin kiti (Hangzhou, Çin) kullanım klavuzu doğrultusunda kit dahilinde ki plate sistemine 1/5 oranında sulandırılarak örnekler yüklendi. TNF- α için eBioscience Platinum ELISA Rat TNF- α kiti (Affymetrix, ABD) kullanım klavuzu doğrultusunda 1/2 sulandırıldı ve plate sistemine yüklendi.

3. Standartlar Epo için 27 IU/L, 18 IU/L, 9 IU/L, 6 IU/L, 3 IU/L, 1,5 IU/L ve 0,75 IU/L konsantrasyonlarında, TNF- α için 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312,5 pg/ml, 156,3 pg/ml, 78,1 pg/ml ve 39,1 pg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı ve her bir konsantrasyondan iki kere olmak üzere plate sistemine yüklendi. Her bir kit için ayrıca kör örnekler hazırlandı, bunlarda yüklendi.
4. İlk inkübasyon periyotlarından sonra plateler yıkandı ve HRP boyası yüklendi. İkinci inkübasyon periyotlarından sonra substrat yüklendi, 10-15 dk sonrasında stop solution yüklendi ve hedef proteinin yoğunluğuna göre ortaya çıkan renk değişimi plate reader sisteminde 450 nm dalga boyu ile okundu (Rayto RT-2100C – Çin).
5. Standart çözeltilerden elde edilen absorbans değerleri kullanılarak Microsoft Office Excel programında bir X-Y dağılım grafiği oluşturuldu. Grafik üzerinde eğilim çizgisi ve buna ait denklem (polinom) gösterildi eğilim çizgisi ve polinom R^2 değeri 1'e yakınsayınca doğru kabul edildi. Örneklerin absorbans değerleri elde edilen formüle konarak konsantrasyonlar hesaplandı.

3.5. Histolojik Yöntemlerle Doku Hasarı ve Protein Tayini

Börek dokusundan yapılan kesitlerde doku hasarı, apoptoz, makrofaj birikimi ve NfKappaB aktivitesi tayini için histolojik ve immunhistokimyasal boyamalar ve bunların analizleri yapıldı.

Eksize edilen sol böbrek dokuları %10'luk nötral-tamponlu formalin solüsyonunda fikse edildi. Böbrek dokuları dereceli alkollerde dehidre edildi, parafine gömüldü ve 3 μ m kalınlığında kesit alındı. Kesitler hematoxylin-eosin (H&E) boyası ile boyandı. Kesitler glomerüler hasar, tübüler hasar, vasküler hasar ve interstisyel inflamasyon açısından korteks ve medullada incelendi. Glomerüler hasar; glomerüler hipertrofi, glomerüler fibrozis, glomerülosklerozis ve fibrinoid nekrozu içerir. Tübüler hasar; protein cast, tübüler epithelial hücrelerde dökülme, tübüler dilatasyon, tübüler atrofi ve tübüler vakuolizasyonu içerir. Vasküler hasar; arteriolar hyalin kalınlaşma, arteriolar ve arterial lümeninde daralma ve belirgin glomerüler büzülme içerir. İnterstisyel inflamasyon; lökosit infiltrasyonunu içerir. Sonuçlar her bir sıçan için semikantitatif olarak 0: hasar yok, 1: minimal hasar, 2: orta hasar, 3: şiddetli hasar şeklinde skorlandı.

3.5.1. Periodic Acid Schiff's (PAS) Boyaması

Böbrek kesitleri periodic acid Schiff's (PAS) boyası ile epitelyal tübüler membranlarda polisakkaritleri, nötral mukopolisakkaritleri ve glikoproteinleri göstermek ve glomerülosklerozisi belirlemek için boyandı.

Kesitlere 5 dk periodic acid uygulandı ve distile su ile yıkandı. Daha sonra, kesitler Schiff's reagent ile 15 dk inkübe edildi ve hematoxylin ile 30 s zit boyama yapıldı. Tübüler hasar; glomeruler ve tübüler basal membran kalınlaşması, tübüler epitelyal hücrelerin bazal membrandan ayrılması, tübüler dilatasyon, çizgili kenar kaybı ve tübüllerde hyalin cast varlığı açısından belirlendi. Sonuçlar kortekste her bir sıçan için semikantitatif olarak, 0: yok, 1: hafif, 2: orta, ve 3: şiddetli şeklinde skorlandı.

3.5.2. Masson's Trichrome Boyaması

Böbrek kesitleri Masson's trichrome ile boyanarak, kollajenden zengin alanlar mavi ve hücrel elementler kırmızı olarak gösterildi. Kollajen birikimi; mavi boyanmış alanların yoğunluğu ve büyüklüğüne göre semikantitatif olarak; 0: yok, 1: hafif, 2: orta, ve 3: şiddetli şeklinde skorlandı.

3.5.3. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Kesitlerde ED-1 boyaması için formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan 5 µm'lik kesitler alınıp, antijen retrieval sonrasında avidin-biotin kompleksi ile boyama yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesi; %10'luk at serumu ile bloke edildi (Scy Tek Laboratories, Logan, UT). Makrofaj infiltrasyonunu değerlendirmek için, kesitler 2 saat monoclonal mouse anti-rat ED1 antibody (1:200, Serotec, Raleigh, NC) ile ve 30 dk LSAB+horseradish peroxidase (Dako, Carpinteria, CA) ile inkübe edildi. İmmun kompleks 3-amino-9-ethyl carbazole ve hematoxylin zit boyaması ile görüntülendi. Pozitif boyanan hücreler tüm alanda incelendi. Sonuçlar perivasküler ve peritübüler alanlarda; 0: yok, 1:hafif dağılım, 2:orta dağılım ve 3:şiddetli dağılım şeklinde semikantitatif olarak skorlandı.

Kesitler formalinde fikse edilip, parafine gömüldü ve NfKappaB immunohistokimyasal analizi yapıldı. Kısaca; kesitler deparafinize edilip, rehidre edildikten sonra, endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için, 30 dk metanolde %3'lük hidrojen peroksitte immerse edildi. Daha sonra kesitler 60 dk goat serum ile inkübe edildi (dilue 1:5; Dakopatts, Milan, Italy), daha sonra +4°C'ta bir gece NfKappaB (rabbit polyclonal, diluted 1:50; Santa Cruz Biotechnology) bırakıldı. Kesitler 0,1M ve pH 7,4'teki Tris buffer solüsyonunda yıkandı ve avidin-biotin horseradish peroxidase kompleksi ile inkübe edildi (ABC kit; Dakopatts). Kesitler %0,05, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride ve %0,03 hidrojen peroksit solüsyonunda immersiyonla boyandı. Tüm kesitlere hematoxylin ile zit boyama yapıldı, dehidre edildi ve kapatıldı. Kontrol reaksiyonlar primer antikorum yokluğuna göre değerlendirildi. Glomerülde, tübül epitel hücrelerinde, infiltre hücrelerde ve endotel ve damar duvarında görülen hücrel dağılım; 0: yok, 1:hafif dağılım, 2:orta dağılım ve 3:şiddetli dağılım şeklinde semikantitatif olarak skorlandı.

3.5.4. TUNEL Yöntemi

Apoptozis sırasında genomik DNA'nın kesilmesi, şablondan bağımsız biçimde serbest 3'-OH uçlarında etiketli nükleotidlerin polimerizasyonunu katalizleyen terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ile etiketlenebilen çift sarmallı, düşük molekül ağırlığına sahip DNA sarmalı parçalarını verebilir (TUNEL reaksiyonu). Apoptotik hücre ölümünün kantitesi, in situ hücre ölüm belirleme kiti (Cat. no.S7101; Chemicon International-ApopTag Plus Peroxidase Kits, USA) kullanılarak değerlendirildi. Önce seri kesitler ksilolde 3 kez deparafinize edildi. Azalan dereceli alkollerden geçirilerek rehidre edilen kesitler, PBS (phosphate-buffered saline)'te yıkandı. Daha sonra, kesitlere oda ısısında 15 dakika proteinase K (20 µg/ml) (Merck) sindirimi sağlandı ve 2 kez PBS'te yıkandı. Daha sonra kesitler oda ısısında ekilibrasyon tamponunda inkübe edildi. Dokular nem çemberinde ve karanlıkta 37°C'de, 60 dakika TUNEL reaksiyon karışımında (%70 reaksiyon tamponu, %30 TdT enzimi) inkübe edildi. Kesitler oda ısısında, 10 dakika durdurma/yıkama tamponunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, kesitler 3 kez PBS'te yıkandı. Daha sonra kesitlere anti-digoxigenin konjugatı uygulandı ve oda ısısında 30 dakika nem çemberinde inkübe edildi. 4 kez daha PBS'te yıkanan kesitlere, 10 dakika DAB (diaminobenzidine) uygulandı. Daha sonra kesitler distile suda 3 kez yıkanarak, kurumaya bırakıldı. Sağ böbrekten elde edilen 4 µm'lik kesitlerdeki tübüler epitelyal nükleuslar TUNEL yöntemi ile işaretlendi. Kahverengi boyanmış olan nükleuslar TUNEL (+) olarak kabul edildi. Korteksteki TUNEL (+) nükleuslar x40'lık objektifte ve rastgele seçilmiş 10 optik alanda sayıldı. Sayılan nükleusların apoptotik indeksi (Aİ) hesaplandı (Aİ=TUNEL yöntemi ile işaretlenen tübüler epitelyal nükleusların sayısı/toplam tübüler epitelyal nükleusların sayısı)

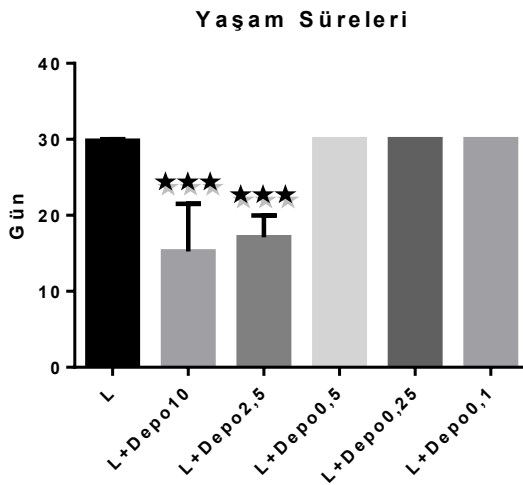
3.6. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için GrapPad Prism6 programı kullanıldı. Gruplar önce Shapiro-Wilk Normality Test kullanılarak normal dağılım gösterip göstermediğine göre analiz edildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar Dunn testi ile değerlendirildi. P değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edildi. Sonuçlar \bar{x} , \pm SEM olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Farklı Dozlarda Kullanılan Darbepoetin- α 'nın Sıçan Yaşam Süreleri Üzerine Etkileri

L-NAME tek başına verilen sıçanlarda 30 gün içinde istatistiksel olarak anlamlı bir kayıp yaşanmazken, Depo'nun L-NAME ile birlikte 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ verildiği sıçanlar ortalama 15,25 gün, 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ verildiği sıçanlar ise 17,1 gün yaşamışlardır. Denenen dozlar içinde 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozlarındaki Depo 30 gün boyunca bir kayba neden olmamışlardır (Şekil 4.1.; Tablo 4.1.).



Şekil 4.1. Tek başına L-NAME verilen sıçanlara göre L-NAME ile birlikte farklı dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanların yaşam süreleri (gün). 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozlarında Depo verilen sıçanların ortalama yaşam süreleri sırayla 15,25 ve 17,1 gün olmuştur ve tek başına L-NAME verilen sıçanlara göre anlamlı derecede düşmüştür. (Değerler $X \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$, $***p<0,001$).

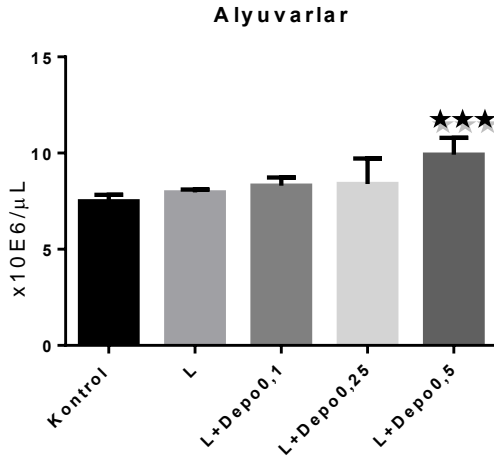
Tablo 4.1. L-NAME verilen guruba göre L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda yaşam süreleri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 ve $p<0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. F değeri= 94,6)

Yaşam Süreleri (gün)				
	Median	%25	%75	L'ye karşı p değerleri
L-NAME	30	30	30	
L+Depo10	12,5	11,25	18,75	$< 0,001***$
L+Depo2,5	16	15	20,25	$< 0,001***$
L+Depo0,5	30	30	30	$> 0,9$
L+Depo0,25	30	30	30	$> 0,9$
L+Depo0,1	30	30	30	$> 0,9$

4.2. Farklı Dozlarda Kullanılan Darbepoetin- α 'nın Sıçan Kan Parametreleri Üzerine Etkisi

30 gün boyunca SF verilen ya da L-NAME tek başına verilen sıçanlara göre L-NAME ile birlikte Depo verilen sıçanlarda alyuvar sayıları, hematokrit yüzdesi ve hemoglobin miktarı verilen Depo'nun dozuna bağlı olarak artmıştır. Bununla birlikte bu artış sadece 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Depo verilen sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır, yine aynı grupta ortaya çıkan değerler her 3 parametre için fizyolojik sınırların üstündedir (Şekil 4.2.a., 4.2.b., 4.2.c.; Tablo 4.2.a., 4.2.b., 4.2.c.). Alyuvar başına hemoglobin konsantrasyonunu ifade eden MCV değeri açısından gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.2.d.; Tablo 4.2.d.). Alyuvar, hematokrit ve hemoglobin değerleri sonucu tedavi dozu olarak belirlenen 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozundaki darbepoetin- α , diğer tedavi gruplarıyla birlikte kontrol grubuna karşı lökosit sayıları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında bir fark görülmemiştir (şekil 4.2.e.; Tablo 4.2.e.).

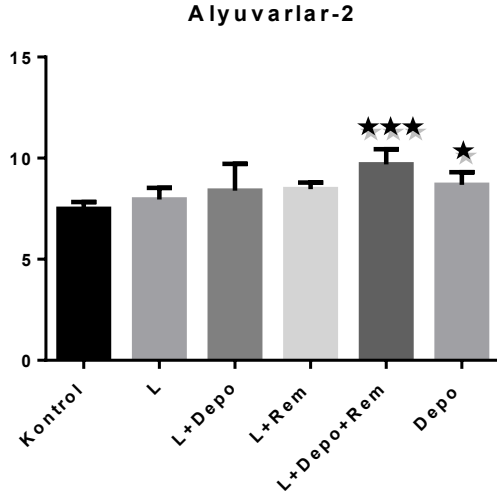
4.2.1. Alyuvarlar



Şekil 4.2.a. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen ya da L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda Alyuvar sayıları (x10E6/μl). L+Depo0,5 grubunun değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir (Değerler \bar{x} , \pm SEM olarak ifade edilmiştir, n=10, ***p<0,001).

Tablo 4.2.a. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen ya da L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda alyuvar sayıları ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler \bar{x} , \pm SEM ve p<0,05 anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. F=17,1)

Alyuvar (x10E6/mL)			
	$\bar{x} \pm$ SEM	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	7,498 ± 0,1054		
L-NAME	7,954 ± 0,1542	=0,6427	
L+Depo0,1	8,303 ± 0,1006	=0,0901	=0,7336
L+Depo0,25	8,388 ± 0,3565	=0,0657	=0,6040
L+Depo0,5	9,922 ± 0,2319	< 0,001***	< 0,001***

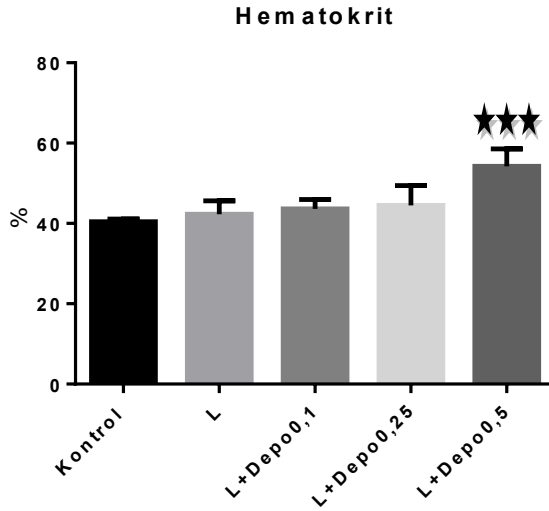


Şekil 4.2.b. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda alyuvar sayıları ($\times 10^6/\mu\text{l}$). L+Depo+Rem ve Depo gruplarının değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir (Değerler \bar{x} , \pm SEM olarak ifade edilmiştir, $n=10$, $***p<0,001$).

Tablo 4.2.b. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda alyuvar sayıları ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 olarak ifade edilmiştir. $F= 10,75$)

Alyuvarlar-2 ($\times 10^6/\mu\text{l}$)					
	Median	%25	%75	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	7,520	7,180	7,778		
L-NAME	8,185	7,395	8,465	$> 0,9$	
L+Depo	8,690	7,740	9,235	$=0,0631$	$=0,9301$
L+Rem	8,530	8,175	8,675	$=0,2103$	$> 0,9$
L+Depo+Rem	9,710	9,175	10,15	$< 0,001***$	$< 0,001***$
Depo	8,865	8,253	9,183	$=0,0299^*$	$=0,4381$

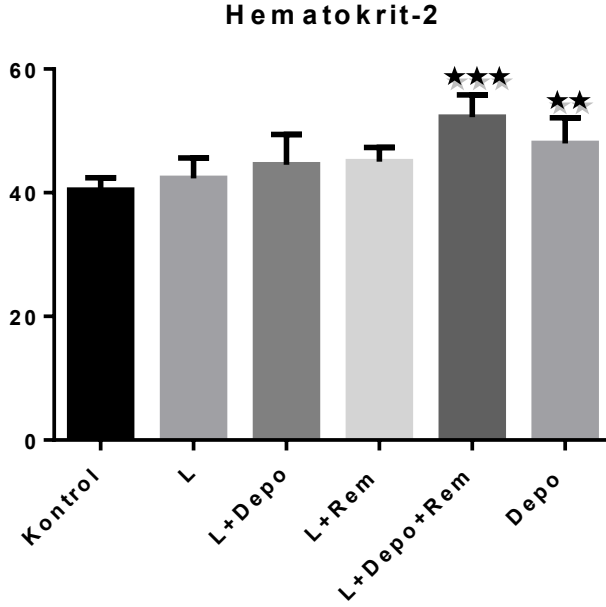
4.2.2. Hematokrit



Şekil 4.2.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen ya da L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda hematokrit değeri (%). L+Depo0,5 grubunun değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$, $***p<0,001$)

Tablo 4.2.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen ya da L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda hematokrit değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %75, %25 ve $p<0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. $F= 31,1$)

Hematokrit (%)					
	Median	%25	%75	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	40,55	38,33	42,56		
L-NAME	43	38,65	44,98	> 0,9	
L+Depo0,1	43,31	41,6	45,49	=0,5067	> 0,9
L+Depo0,25	46,46	43,66	47,44	=0,0560	> 0,9
L+Depo0,5	53,96	51,76	56,71	< 0,001***	< 0,001***

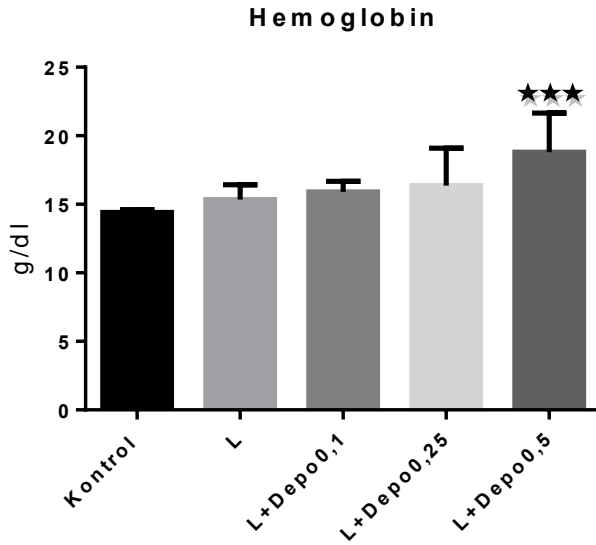


Şekil 4.2.d. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda hematokrit değeri (%).L+Depo+Rem ve Depo gruplarının değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10, ***p<0,001).

Tablo 4.2.d. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda hematokrit değeri (%) ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 ve p<0,05 anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. F=16,62).

Hematokrit-2 (%)					
	Median	%25	%75	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	40,55	38,33	42,56		
L-NAME	43,00	38,65	44,98	> 0,9	
L+Depo	46,46	43,66	47,44	=0,2428	> 0,9
L+Rem	44,88	43,23	46,97	=0,3579	> 0,9
L+Depo+Rem	51,86	49,66	55,13	< 0,001***	< 0,001***
Depo	47,98	45,01	51,84	=0,0059**	=0,0669

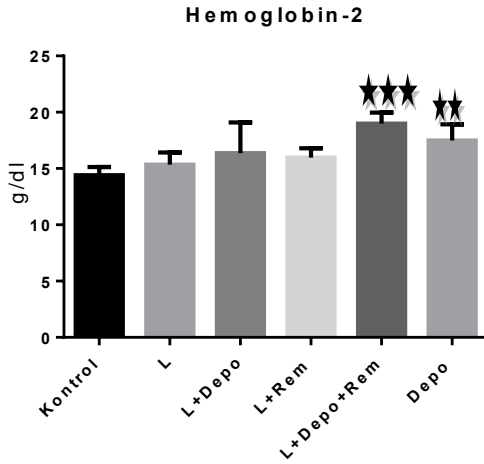
4.2.3. Hemoglobin



Şekil 4.2.e. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen ya da L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda hemoglobin değeri (gr/dl). L+Depo0,5 grubunun değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$, $***p<0,001$)

Tablo 4.2.e. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen ya da L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda hemoglobin değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 ve $p<0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. $F=10,06$)

Hemoglobin (gr/dl)					
	Median	%25	%75	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	14,40	13,90	15,20		
L-NAME	15,65	14,20	16,40	> 0,9	
L+Depo0,1	15,95	15,45	16,45	=0,1254	> 0,9
L+Depo0,25	16,60	12,90	18	=0,1395	> 0,9
L+Depo0,5	19,25	18,40	20,53	< 0,001***	<0,001***

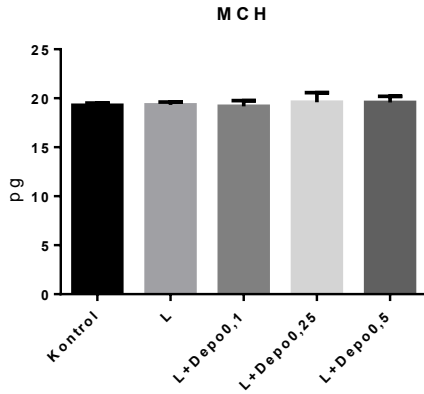


Şekil 4.2.f. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda hemoglobin değeri (g/dl).L+Depo+Rem ve Depo gruplarının değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10, ***p<0,001).

Tablo 4.2.f. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda hemoglobin değeri (g/dl) ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 ve p<0,05 anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. F=13,65).

Hemoglobin-2 (g/dl)					
	Median	%25	%75	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	14,40	13,90	15,20		
L-NAME	15,65	14,20	16,40	> 0,9	
L+Depo	16,95	14,93	18,43	=0,0489	=0,8886
L+Rem	15,90	15,65	16,55	> 0,9	> 0,9
L+Depo+Rem	19,10	18,20	19,85	< 0,001***	< 0,001***
Depo	17,75	16,50	18,58	=0,0038**	=0,0985

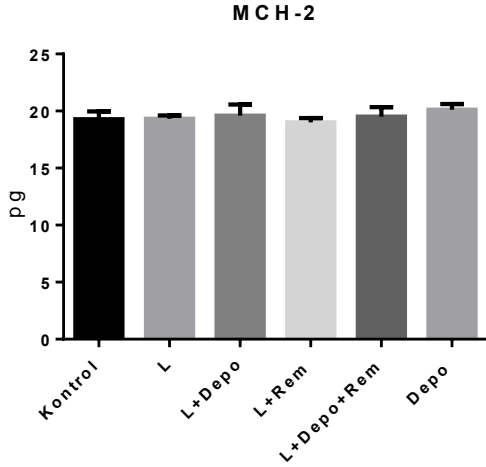
4.2.4. MCH



Şekil 4.2.g. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen ya da L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda eritrosit başına düşen hemoglobin konsantrasyonunu gösteren MCH değeri (pg). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, n=10)

Tablo 4.2.g. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen ya da L-NAME ile birlikte çeşitli dozlarda Depo verilen dişi yetişkin sıçanlarda eritrosit başına düşen hemoglobin konsantrasyonunu gösteren MCH değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x}, \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir. F= 0,5437)

MCH (pg)			
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	19,06 ± 0,2426		
L-NAME	18,57 ± 0,1107	> 0,9	
L+Depo0,1	14,07 ± 0,2198	> 0,9	> 0,9
L+Depo0,25	19,57 ± 0,3645	= 0,8776	> 0,9
L+Depo0,5	21,14 ± 0,2347	> 0,9	> 0,9

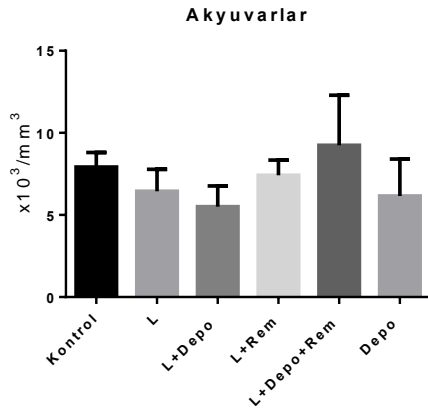


Şekil 4.2.h. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda eritrosit başına düşen hemoglobin konsantrasyonunu gösteren MCH değeri (pg). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10)

Tablo 4.2.h. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda eritrosit başına düşen hemoglobin konsantrasyonunu gösteren MCH değeri (pg) ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x}, \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir. F= 2,302)

MCH-2 (pg)			
	$\bar{x} \pm SEM$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	19,28±0,2426		
L-NAME	19,33±0,1107	> 0,9	
L+Depo	19,60±0,3645	=0,9302	=0,9711
L+Rem	19,00±0,148	=0,9649	=0,9359
L+Depo+Rem	19,50±0,3207	=0,9854	=0,9964
Depo	20,11±0,1895	=0,1641	=0,2507

4.2.5. Akyuvarlar

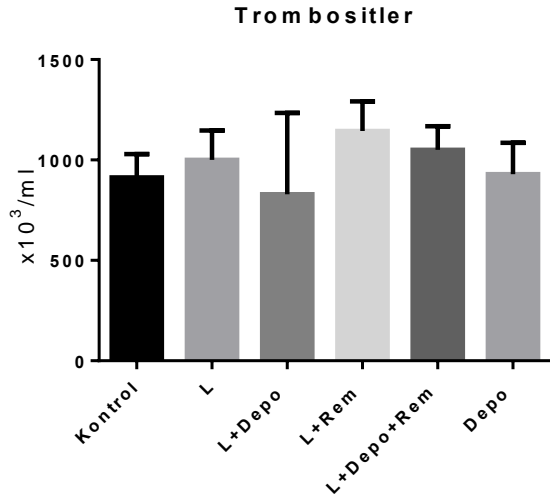


Şekil 4.2.i. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda akyuvar değeri ($\times 10^3/\text{mm}^3$). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$)

Tablo 4.2.i. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda akyuvar değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x}, \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir. $F=3,097$)

Akyuvarlar ($10^3/\text{mm}^3$)			
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	7,918 ± 0,8836		
L-NAME	6,450 ± 0,5028	= 0,7358	
L+Depo	5,509 ± 0,4757	= 0,2309	> 0,9
L+Rem	7,413 ± 0,3524	> 0,9	> 0,9
L+Depo+Rem	9,239 ± 1,153	= 0,8112	= 0,1368
Depo	6,153 ± 0,8499	= 0,5627	> 0,9

4.2.6. Trombositler



Şekil 4.2.j. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda trombosit değeri ($\times 10^3/\text{ml}$). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$)

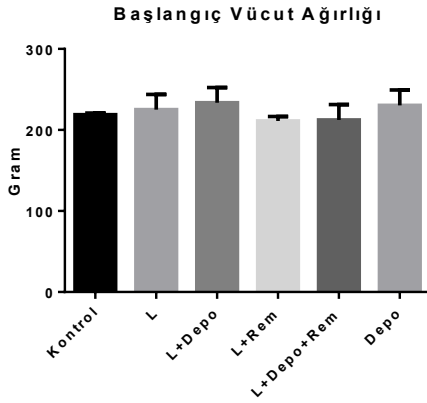
Tablo 4.2.j. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda trombosit değeri ($\times 10^3/\text{ml}$) ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x}, \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir. $F= 2,228$)

Trombositler ($10^3/\text{mm}^3$)			
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	913,5 ± 41,06		
L-NAME	1000 ± 55,56	> 0,9	
L+Depo	828,8 ± 181,4	> 0,9	= 0,6315
L+Rem	1145 ± 55,67	= 0,1939	= 0,7070
L+Depo+Rem	1051 ± 44,31	= 0,7205	> 0,9
Depo	929,4 ± 59,07	> 0,9	> 0,9

4.3. Tedavi Grupları Arasında Ağırlık Değişimleri

Tedavi grupları arasında başlangıçta herhangi bir fark görülmesi de deney bitiş ağırlıkları açısından tek başına 0,25 µg/kg dozunda darbepoetin-a verilen grupta anlamlı bir artış gözlenmiştir. Böbrek ağırlıkları açısından ise herhangi bir grupta herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.3.a., 4.3.b., 4.3.c.; Tablo 4.3.a., 4.3.b., 4.3.c.).

4.3.1. Başlangıç Vücut Ağırlığı

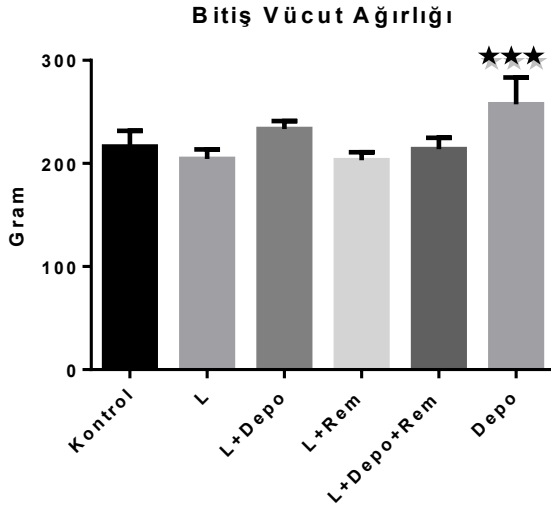


Şekil 4.3.a. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deneyin başlangıcında kaydedilen vücut ağırlık değeri (gr). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10)

Tablo 4.3.a. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deneyin başlangıcında kaydedilen vücut ağırlık değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 olarak ifade edilmiştir. F= 2,588)

Başlangıç Vücut Ağırlığı (gr)					
	Median	%25	%75	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	216	215	224,5		
L-NAME	225	207,8	239,5	> 0,9	
L+Depo	247	216	248	> 0,9	> 0,9
L+Rem	211	205	215	> 0,9	> 0,9
L+Depo+Rem	207,5	201,5	215	> 0,9	> 0,9
Depo	239	212,8	241,5	> 0,9	> 0,9

4.3.2. Bitiş Vücut Ağırlığı

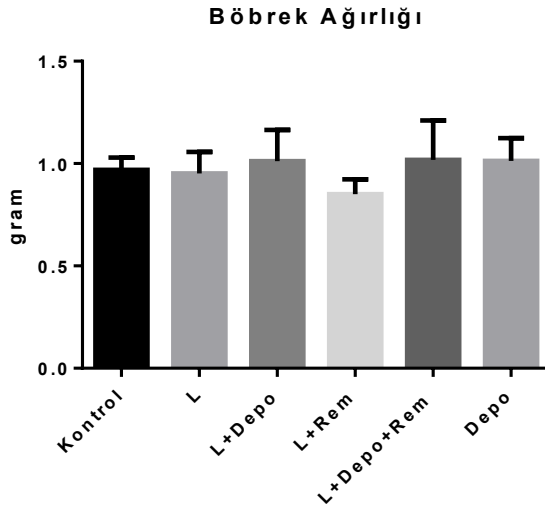


Şekil 4.3.b. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda ölçülen vücut ağırlık değeri (gr). Depo'nun tek başına verildiği grubunun deney sonunda ölçülen ağırlık değeri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10, ***p<0,001)

Tablo 4.3.b. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda ölçülen vücut ağırlık değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm SEM$ ve p<0,05 anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. F=16,04)

Bitiş Vücut Ağırlığı (gr)			
	$\bar{x} \pm SEM$	Kontrolle karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	216,3±5,473		
L-NAME	204,3±3,069	= 0,5847	
L+Depo	233,3±3,221	= 0,2535	= 0,0048**
L+Rem	203,1±2,939	= 0,5508	> 0,9
L+Depo+Rem	213,8±3,936	> 0,9	= 0,7818
Depo	257,4±8,656	< 0,001***	< 0,001***

4.3.3. Böbrek Ağırlığı



Şekil 4.3.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deneyin sonunda kaydedilen sol böbrek ağırlık değeri (gr). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, n=10).

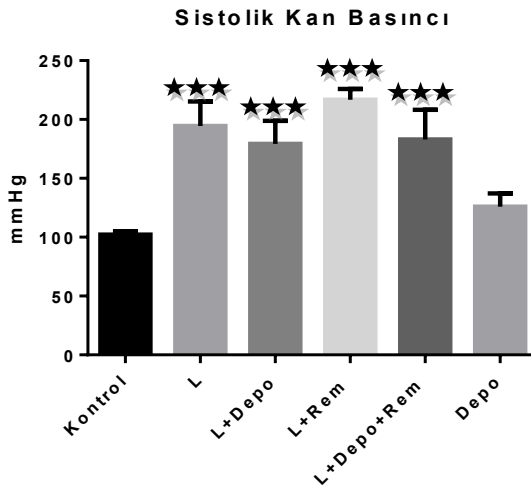
Tablo 4.3.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deneyin sonunda kaydedilen sol böbrek ağırlık değeri ve istatistiksel analiz sonuçları (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir. F= 1,493).

Böbrek Ağırlık (gr)			
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	0,9696 \pm 0,06043		
L-NAME	0,9514 \pm 0,04003	> 0,9	
L+Depo	1,011 \pm 0,05795	> 0,9	> 0,9
L+Rem	0,8507 \pm 0,02746	=0,5995	=0,7489
L+Depo+Rem	1,018 \pm 0,07246	> 0,9	> 0,9
Depo	1,013 \pm 0,04237	> 0,9	> 0,9

4.4. Tedavi Grupları Arasında Kardiyovasküler Parametreler

L-NAME verilen tüm gruplarda kan basıncının arttığı gözlenmiştir. L-NAME ile birlikte verilen Depo sistolik basınçta L grubuna göre hafif bir düşüş, Rem ise yine L grubuna göre hafif bir artışa sebep olsa da bu istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmamıştır. Diyastolik basınç açısından da tablo sistolik basınçla aynıdır. Kalp hızı ise L-NAME ile birlikte Depo verilen gruplarda anlamlı derecede azalmıştır. Sistolik basınçtan diyastolik basıncı çıkartarak elde edilen ve kalbin yaptığı iş olarak değerlendirilen nabız basıncı verilerine göre ise yine L-NAME verilen tüm gruplar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.4.a., 4.4.b., 4.4.c., 4.4.d.; Tablo 4.4.a., 4.4.b., 4.4.c., 4.4.d.).

4.4.1. Sistolik Kan Basıncı

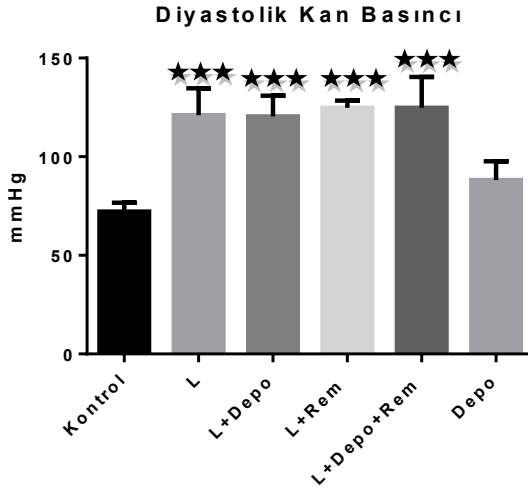


Şekil 4.4.a. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda femoral arterden ölçülen sistolik kan basıncı (mmHg). L-NAME verilen tüm gruplarda sistolik kan basıncı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Darbepoetin-a'nın tek başına verildiği grupta hafif bir artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, n=10, ***p<0,001).

Tablo 4.4.a. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda femoral arterden ölçülen sistolik kan basıncı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ve p<0,05 anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. F=50,29)

Sistolik Kan Basıncı (mmHg)			
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	102,3± 2,76		
L-NAME	194,5±7,855	< 0,001***	
L+Depo	179,3±7,429	< 0,001***	=0,05422
L+Rem	216,8±3,439	< 0,001***	=0,1555
L+Depo+Rem	183,9±9,514	< 0,001***	=0,7897
Depo	125,9±4,29	=0,0958	< 0,001***

4.4.2. Diyastolik Kan Basıncı

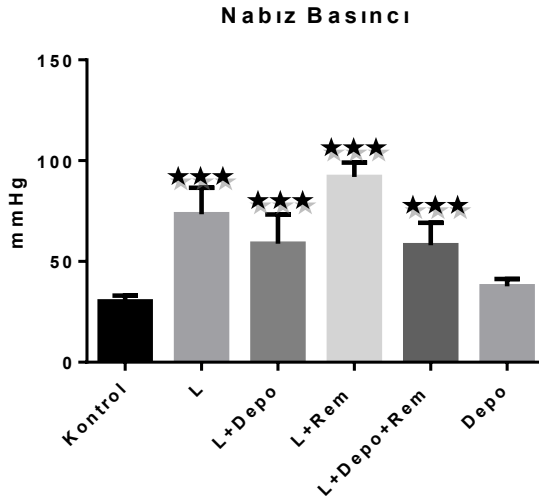


Şekil 4.4.b. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda femoral arterden ölçülen diyastolik kan basıncı (mmHg). L-NAME verilen tüm gruplarda diyastolik kan basıncı, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Darbepoetin-a'nın tek başına verildiği grupta hafif bir artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$, $***p<0,001$).

Tablo 4.4.b. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda femoral arterden ölçülen diyastolik kan basıncı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ve $p<0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. $F=28,42$)

Diyastolik Kan Basıncı (mmHg)			
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Kontrolle karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	72,14±4,578		
L-NAME	121±5,146	< 0,001***	
L+Depo	120,4±3,964	< 0,001***	> 0,9
L+Rem	124,8±1,365	< 0,001***	> 0,9
L+Depo+Rem	124,9±5,872	< 0,001***	> 0,9
Depo	88,13±3,613	=0,1101	< 0,001***

4.4.3. Nabız Basıncı

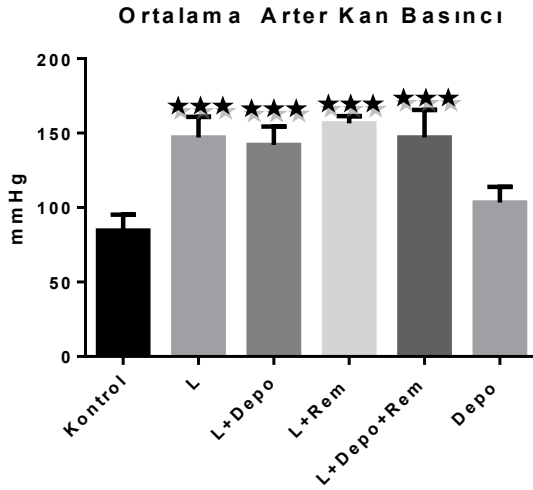


Şekil 4.4.d. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda ölçülen sistolik basınçtan diyastolik basıncın çıkartılmasıyla hesaplanan nabız basıncı değeri (mmHg). L-NAME verilen tüm gruplarda nabız basıncı, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Depo'nun tek başına verildiği grupta hafif bir artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10, ***p<0,001).

Tablo 4.4.d. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda ölçülen sistolik basınçtan diyastolik basıncın çıkartılmasıyla hesaplanan nabız basıncı değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm SEM$ ve p<0,05 anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. F=35,91)

Nabız Basıncı (mmHg)					
	$\bar{x} \pm SEM$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri	Kontrole göre % değişim	L'ye göre % değişim
Kontrol	30,13±2,901				
L-NAME	73,46±4,966	< 0,001***		%244	
L+Depo	58,87±5,479	< 0,001***	=0,1073	%195	%80
L+Rem	91,96±2,693	< 0,001***	=0,0198*	%305	%125
L+Depo+Rem	58,1±4,18	< 0,001***	=0,0790	%193	%79
Depo	37,73±1,34	=0,7073	< 0,001***	%125	%51

4.4.4. Ortalama Arter Kan Basıncı

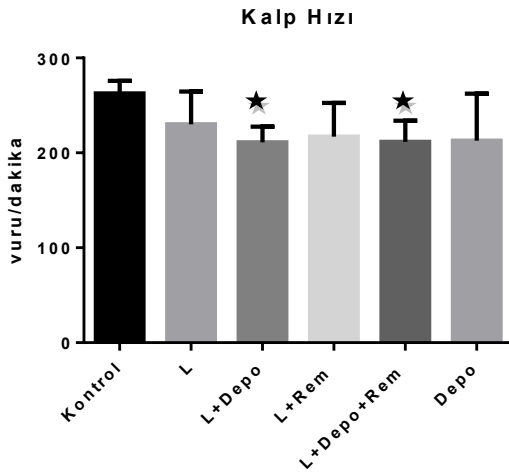


4.4.e. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda ortalama arter kan basıncı (mmHg). L-NAME verilen tüm gruplarda ortalama arter kan basıncı, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Depo'nun tek başına verildiği grupta hafif bir artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$, $***p<0,001$).

Tablo 4.4.e. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda ortalama arter kan basıncı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ve $p<0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. $F=37,54$)

Ortalama Arter Kan Basıncı (mmHg)			
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	84,51 ± 3,819		
L-NAME	147,1 ± 5,200	< 0,001***	
L+Depo	142,1 ± 4,660	< 0,001***	> 0,9
L+Rem	156,6 ± 1,824	< 0,001***	=0,7129
L+Depo+Rem	147,1 ± 7,012	< 0,001***	>0,9
Depo	103,4 ± 3,980	=0,0599	< 0,001***

4.4.5. Kalp Hızı



Şekil 4.4.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda kalp hızı (vuru/dakika). L-NAME ile birlikte Depo verilen gruplarda kalp hızı istatistiksel olarak anlamlı derecede yavaşlamıştır (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$, $*p<0,05$).

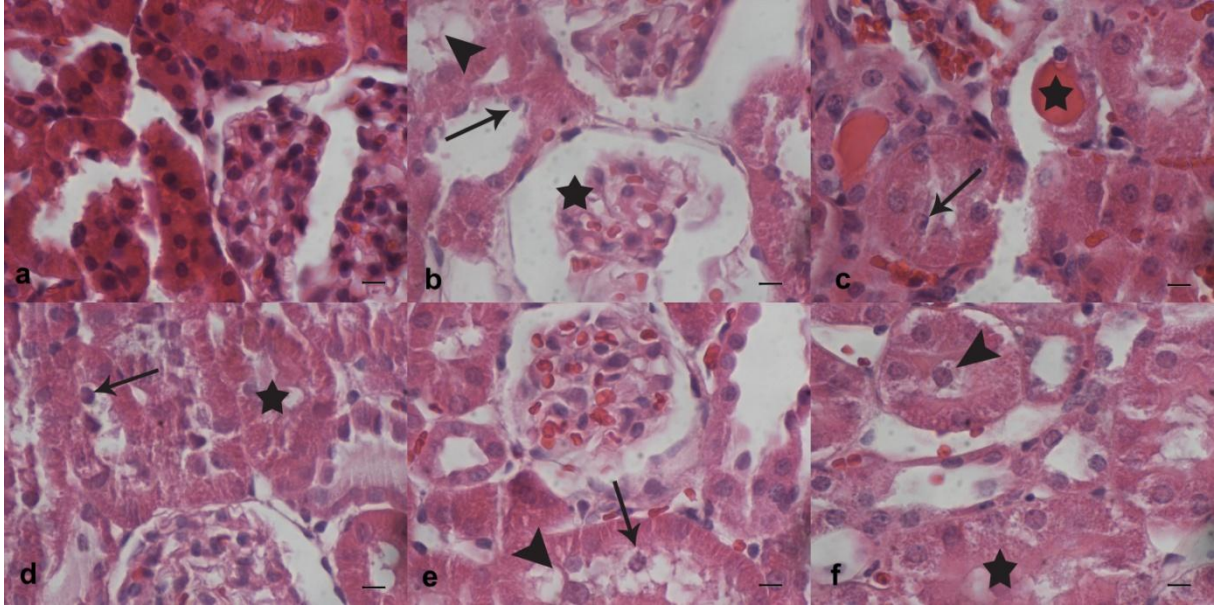
Tablo 4.4.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda kalp hızı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=10$ ve $p<0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. $F=2,761$)

Kalp Hızı (vuru/dakika)			
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	262,5 ± 13,33		
L-NAME	230 ± 13,09	=0,4461	
L+Depo	211 ± 5,877	=0,0453*	=0,8854
L+Rem	217,1 ± 13,4	=0,1255	> 0,9
L+Depo+Rem	211,6 ± 7,892	=0,0495*	=0,8989
Depo	212,9 ± 18,74	=0,0738	> 0,9

4.5. İmmunhistokimya Sonuçları

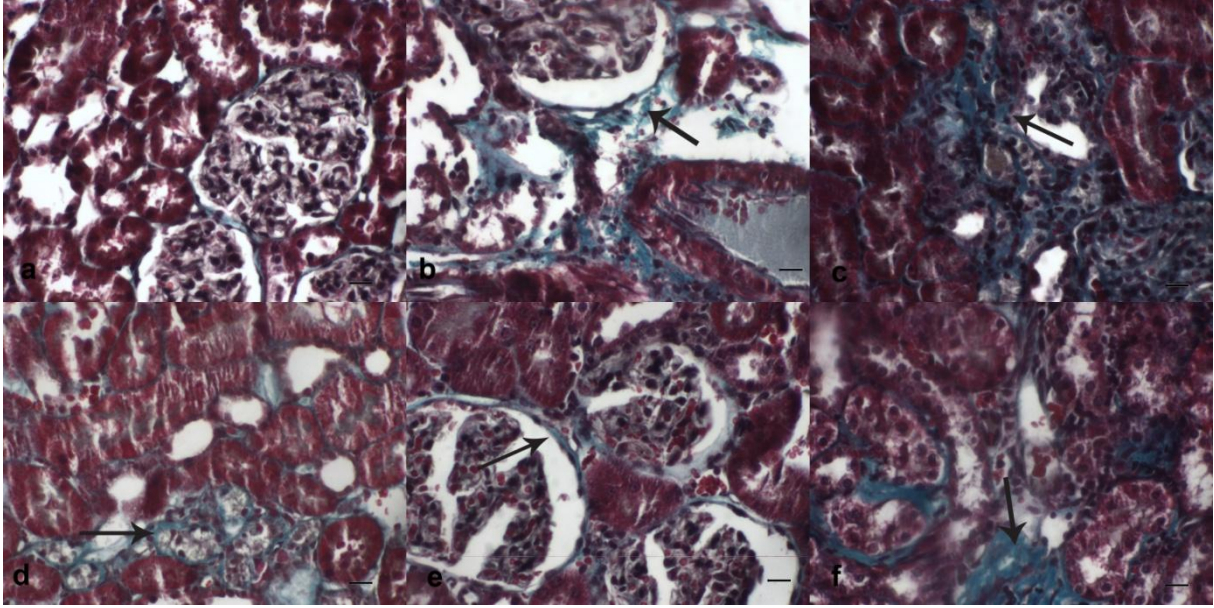
H&E boyama ile kontrol grubunda görülmeyen glomerulonekrozis, tübül epitel hücrelerinde dökülme ve protein cast varlığı tüm tedavi gruplarında değişen oranlarda tespit edilmiştir. Masson's Trichrome boyama ile kontrol grubunda görülmeyen kollajen birikimi tüm tedavi gruplarında değişen oranlarda tespit edilmiştir. PAS boyama ile kontrol grubunda görülmeyen bazal membrandan ayrılma, hyalin cast ve bazal membran kalınlaşması tedavi gruplarında değişen oranlarda tespit edilmiştir. Apoptotik indeks analizi TUNEL boyama yöntemi sonucunda ise L-NAME böbrek hücrelerinde apoptozisi anlamlı derecede artırmış fakat ayrı ayrı ya da birlikte Depo ve Rem tedavisi bu etkiyi engellemiştir. Makrofaj birikimini analiz eden ED-1 boyama tekniği sonucu L grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış; L+Rem grubunda makrofaj birikimi daha da çok artmıştır. Depo verilen tüm gruplarda Makrofaj birikimi kontrol seviyesinde kalmıştır. NfKappaB boyaması ile yapılan analizde tüm tedavi grupları kontrole göre artmış ve bu artış L+Rem grubu dışındakilerde anlamlı derecelerde olmuştur. (Şekil 4.5.a., 4.5.b., 4.5.c., 4.5.d., 4.5.e., 4.5.f., 4.5.g., 4.5.h., 4.5.i.; Tablo 4.5.a., 4.5.b., 4.5.c.).

4.5.1. H&E Boyama



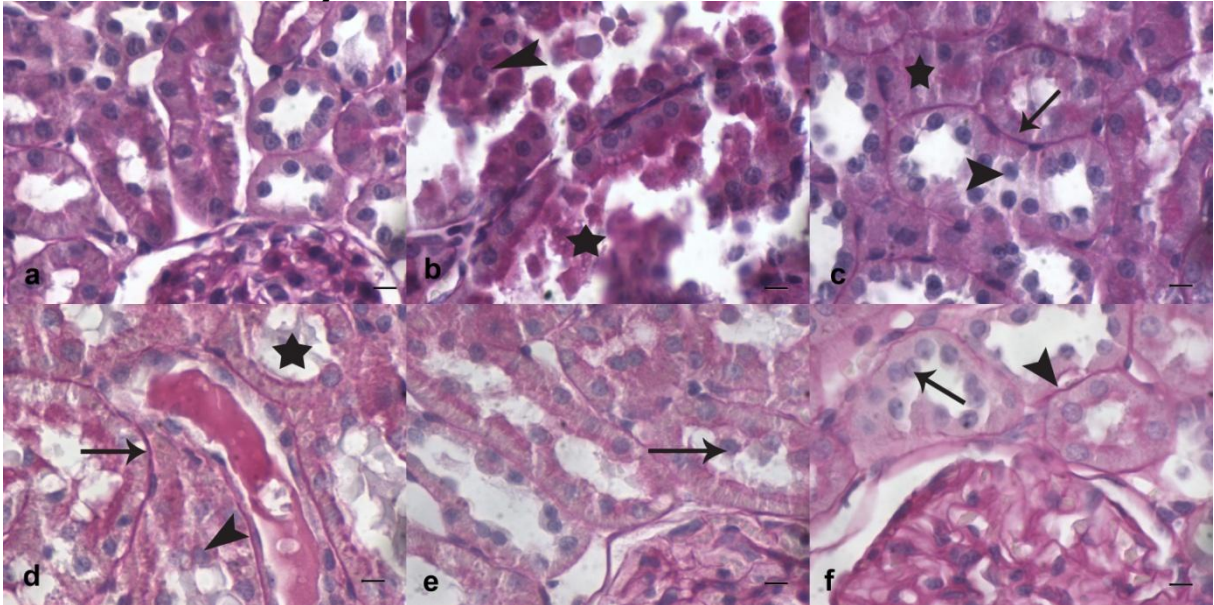
Şekil 4.5.a. H&E, a) Kontrol grubunda böbrek korteksi normal görünüm. b) L grubunda kortekste glomerülosklerozis (yıldız), protein cast (ok başı) ve tübül epitel hücrelerinde dökülme (ok). c) L+Depo grubunda protein cast (yıldız) ve tübül epitel hücrelerinde dökülme (ok). d) L+Rem grubunda tübül epitel hücrelerinde dökülme (ok) ve protein cast (yıldız). e) L+Depo+Rem grubunda tübül epitel hücrelerinde dökülme (ok) ve tübüler vakuolizasyon (ok başı). f) Depo grubunda tübül epitel hücrelerinde dökülme (ok başı) ve protein cast (yıldız). Kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda H&E boyaması ile tespit edilebilen doku hasarı parametreleri değişen oranlarda görülebilmektedir. 40X büyütme, Scale Bar 10 µm.

4.5.2. Masson's Trichrome Boyama



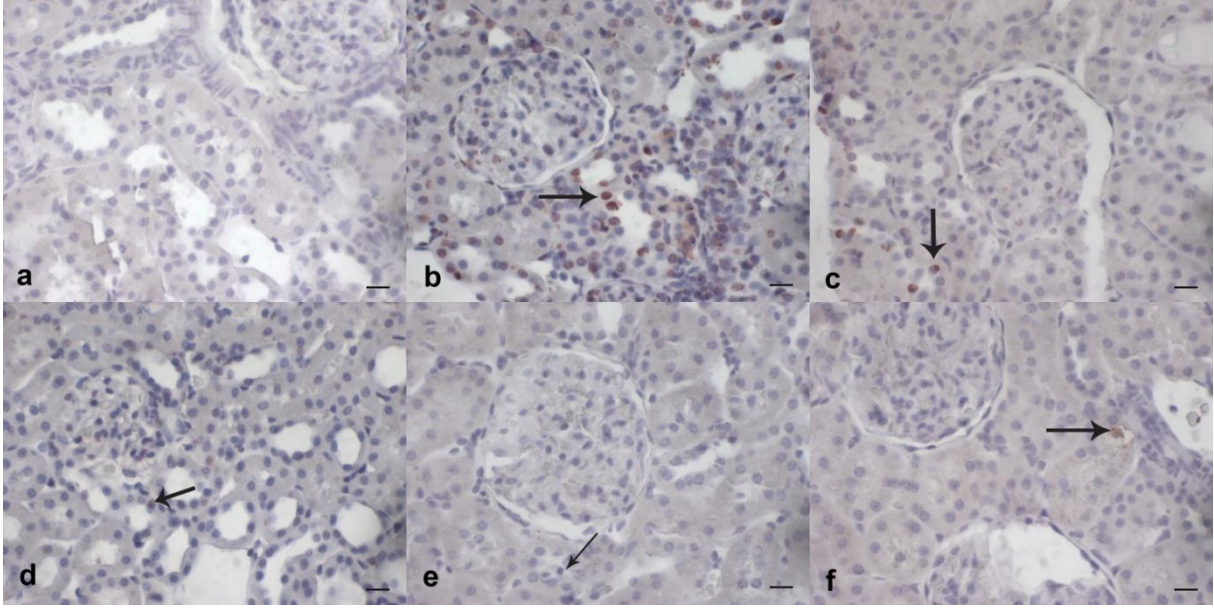
Şekil 4.5.b. Masson's Trichrome. a) Kontrol grubunda böbrek korteksi normal görünüm. b) L grubunda kollajen birikimi (ok). c) L+Depo grubunda kollajen birikimi (ok). d) L+Rem grubunda kollajen birikimi (ok). e) L+Depo+Rem grubunda kollajen birikimi (ok). f) Depo grubunda kollajen birikimi (ok). Kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda kollajen birikimi değişen oranlarda görülebilmektedir. 20X büyütme, Scale Bar 20 μ m.

4.5.3. PAS Boyama

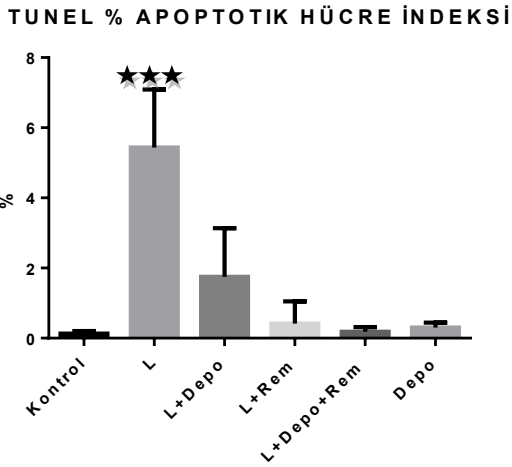


Şekil 4.5.c. PAS, a) Kontrol grubunda böbrek korteksi normal görünüm. b) L grubunda bazal membrandan ayrılma (ok başı) ve hyalin cast (yıldız). c) L+Depo grubunda bazal membrandan ayrılma (ok başı), hyalin cast (yıldız) ve bazal membran kalınlaşması (ok). d) L+Rem grubunda hyalin cast (yıldız), bazal membrandan ayrılma (ok başı) ve bazal membran kalınlaşması (ok). e) L+Depo+Rem grubunda bazal membrandan ayrılma (ok). f) Depo grubunda bazal membrandan ayrılma (ok) ve bazal membran kalınlaşması (ok başı). Kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda PAS boyaması ile tespit edilebilen doku hasarı parametreleri değişen oranlarda görülebilmektedir. 40X büyütme, Scale Bar 10 μ m.

4.5.4. TUNEL Boyama



Şekil 4.5.d. TUNEL. a) Kontrol grubunda böbrek korteksi normal görünüm. b) L grubunda kortekste apoptotik hücreler (ok). c) L+Depo grubunda kortekste apoptotik hücreler (ok). d) L+Rem grubunda kortekste apoptotik hücreler (ok). e) L+Depo+Rem grubunda kortekste apoptotik hücreler (ok). f) Depo grubunda kortekste apoptotik hücreler (ok), 20X büyütme, Scale Bar 20 µm.

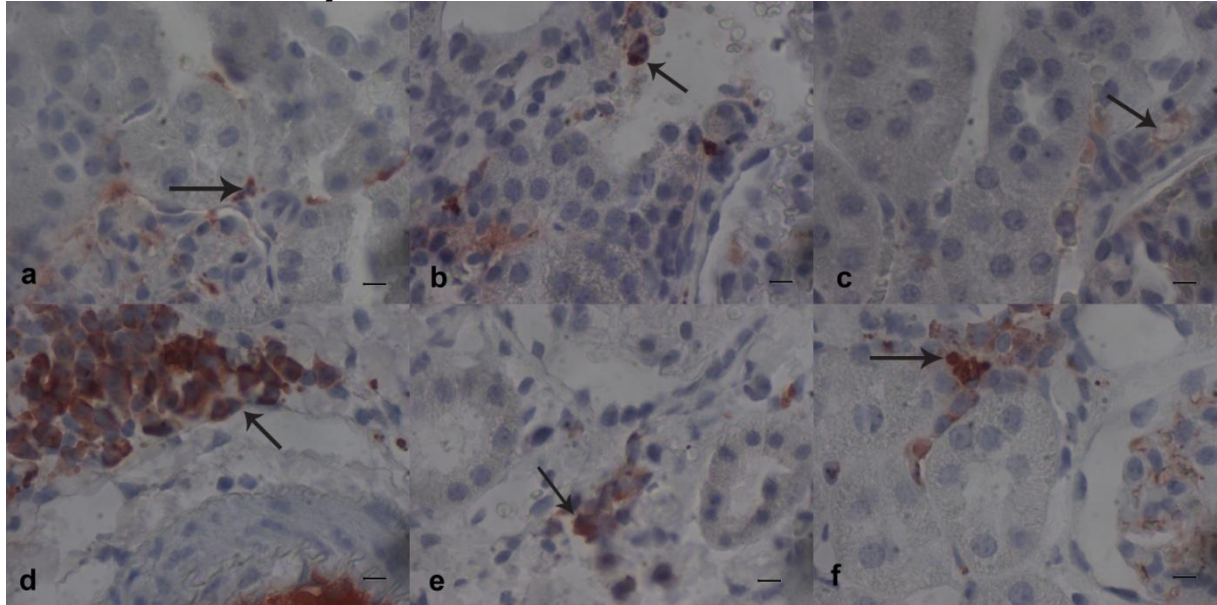


Şekil 4.5.e. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusu kesitlerinden yapılan TUNEL boyama sonucu elde edilen apoptotik hücre indeksi (%).L-NAME'nin tek başına verildiği grupta apoptotik hücre indeksi anlamlı kontrol grubuna göre derecede yükselirken L-NAME ile birlikte verilen Darbepoetin- α ve Remicade ya da her ikisi birlikte apoptotik hücre indeksi değerini düşürmüşlerdir (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10, ***p<0,001).

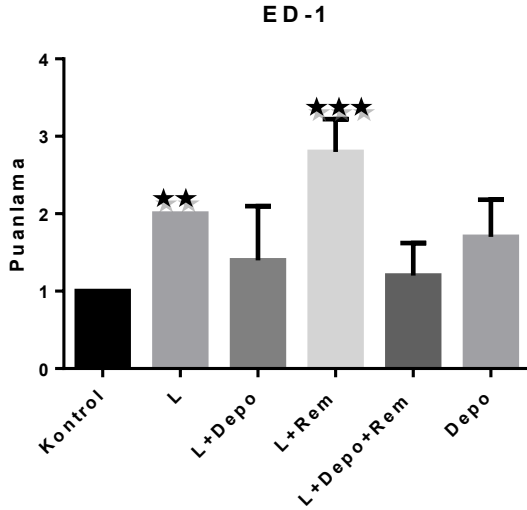
Tablo 4.5.a. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusu kesitlerinden yapılan TUNEL boyama sonucu elde edilen apoptotik hücre indeksi ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 ve $p < 0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. $F=37,42$.)

TUNEL apoptotik hücre indeksi (%)					
	Median	%25	%75	Kontrolle karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	0,0671	0,0298	0,2593		
L-NAME	4,971	4,123	6,984	$< 0,001^{***}$	
L+Depo	1,983	1,520	3,435	$=0,0921$	$< 0,001^{***}$
L+Rem	0,1686	0,0292	0,740	$> 0,9$	$< 0,001^{***}$
L+Depo+Rem	0,1369	0,836	0,3384	$> 0,9$	$< 0,001^{***}$
Depo	0,2892	0,1806	0,4174	$=0,9994$	$< 0,001^{***}$

4.5.5. ED1 Boyama



Şekil 4.5.f. ED1, a) Kontrol grubunda peritübüler alanda hafif dağılım gösteren ED1(+) hücreler (ok). b) L grubunda peritübüler alanda orta dağılım gösteren ED1(+) hücreler (ok). c) L+Depo grubunda peritübüler alanda hafif dağılım gösteren ED1(+) hücreler (ok). d) L+Rem grubunda peritübüler alanda şiddetli dağılım gösteren ED1(+) hücreler (ok). e) L+Depo+Rem grubunda peritübüler alanda hafif dağılım gösteren ED1(+) hücreler (ok). f) Depo grubunda peritübüler alanda orta dağılım gösteren ED1(+) hücreler (ok), 40X büyütme, Scale Bar 10 μ m.



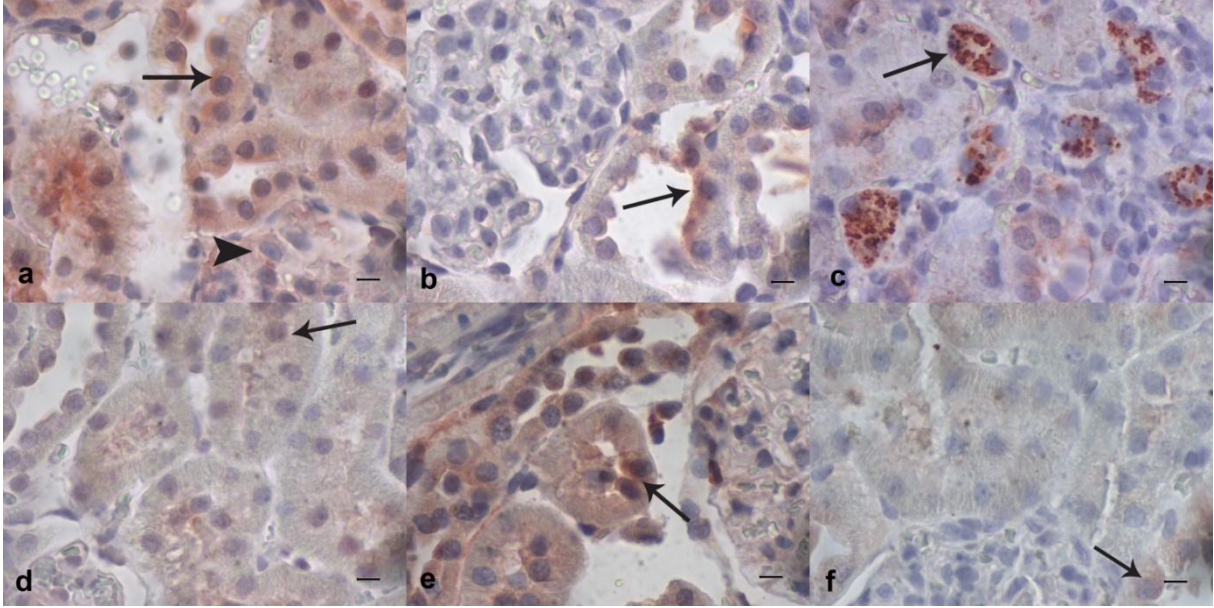
Şekil 4.5.g. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusu kesitlerinden yapılan ED-1 boyamasının puanlama grafiği. Kontrol grubuna göre L-NAME verilen ve L-NAME ile birlikte Remicade verilen gruplarda makrofaj hücre birikimi anlamlı derecede artmıştır(Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10, **p<0,01 ***p<0,001).

Tablo 4.5.b. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusu kesitlerinden yapılan ED-1 boyamasının puanlama değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 ve p<0,05 anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. F= 23,7)

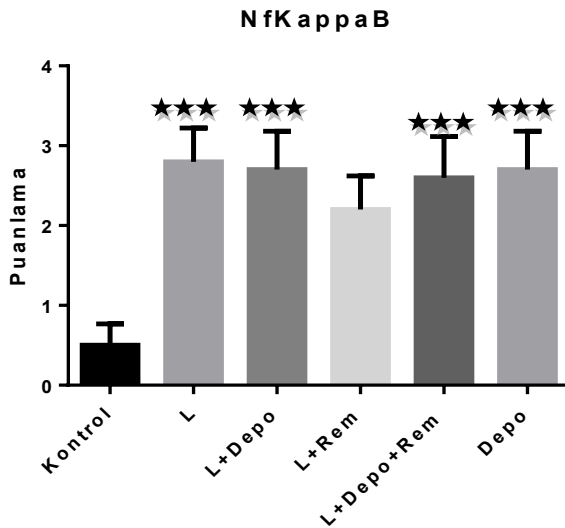
ED-1(0-4 arası puanlama)					
	Median	%25	%75	Kontrolle karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	1	1	1		
L-NAME	2	2	2	=0,0055**	
L+Depo	1	1	2	> 0,9	=0,3473
L+Rem	3	2,75	3	< 0,001**	> 0,9
L+Depo+Rem	1	1	1,25	> 0,9	=0,0655
Depo	2	1	2	=0,1893	> 0,9

Kontrolle karşı % değişim	L'ye karşı % değişim
%200	
%140	%70
%280	%140
%120	%60
%170	%85

4.5.6. NfKappaB Boyama



Şekil 4.5.h. NfKappaB; a) Kontrol grubunda glomerülde (ok başı) ve tübül epitel hücrelerinde (ok) şiddetli dağılım gösteren NfKappaB (+) hücreler. b) L grubunda tübül epitel hücrelerinde orta dağılım gösteren NfKappaB (+) hücreler (ok). c) L+Depo grubunda tübül epitel hücrelerinde şiddetli dağılım gösteren NfKappaB (+) hücreler (ok). d) L+Rem grubunda tübül epitel hücrelerinde orta dağılım gösteren NfKappaB (+) hücreler (ok). e) L+Depo+Rem grubunda tübül epitel hücrelerinde şiddetli dağılım gösteren NfKappaB (+) hücreler (ok). f) Depo grubunda tübül epitel hücrelerinde orta dağılım gösteren NfKappaB (+) hücreler (ok), (40X, Scale Bar 10 µm).



Şekil 4.3.i. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusu kesitlerinden yapılan NfKappaB boyaması puanlama grafiği. L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo verilen hem de Depo ile birlikte Rem verilen ve Depo tek başına verilen gruplarda makrofaj birikimi NfKappaB yoğunluğu anlamlı derecede artmış fakat bu artış L-NAME ile birlikte Rem verilen grupta tespit edilememiştir. (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10, ****p<0,001)

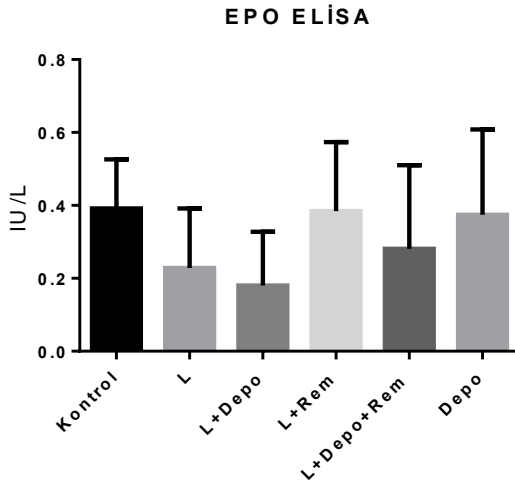
Tablo 4.5.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusu kesitlerinden yapılan NfKappaB boyaması puanlama değeri ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskall-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 ve $p < 0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. $F=25,81$)

NfKappaB (0-4 arası puanlama)					
	Median	%25	%75	Kontrolle karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	0	0	1,25		
L-NAME	3	2,75	3	< 0,001***	
L+Depo	3	2	3	< 0,001***	> 0,9
L+Rem	2	2	3	=0,2298	=0,4179
L+Depo+Rem	3	2	3	< 0,001***	> 0,9
Depo	3	2	3	< 0,001***	> 0,9

4.6. ELISA Sonuçları

ELISA sonuçlarına göre ölçülen Epo ve TNF- α miktarları gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermezken, TNF- α miktarı L-NAME ile birlikte kontrol grubuna göre iki kattan daha fazla oranda artmış ve tedavi gruplarında bu artış kontrol seviyesine çekilmiştir (Şekil 4.6.a., 4.6.b.; Tablo 4.6.a, 4.6.b.)

4.6.1. Epo ELISA



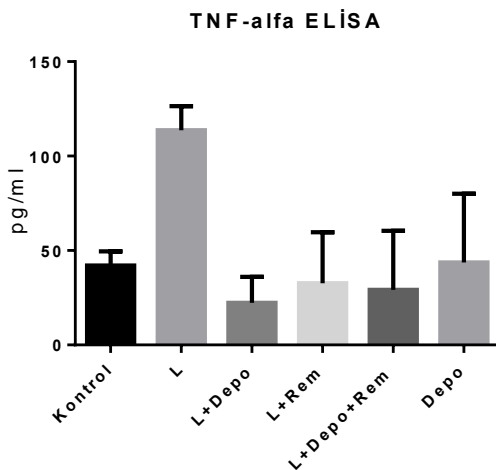
Şekil 4.6.a. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda alınan kan plazmasından ELISA yöntemi ile ölçülen Epo miktarı (IU/L). Gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık görülmesi de L-NAME ile birlikte Depo verilen grupta kontrol grubuna göre %50 civarında bir azalma gözlenmiştir. (Değerler $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, n=10)

Tablo 4.6.a. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda alınan kan plazmasından ELISA yöntemi ile ölçülen Epo miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir. $F=0,9705$)

Epo ELISA (IU/L)			
	$\bar{x} \pm SEM$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	0,3913 \pm 0,1348		
L-NAME	0,2287 \pm 0,06651	=0,8043	
L+Depo	0,1805 \pm 0,06021	=0,5851	> 0,9
L+Rem	0,3845 \pm 0,07734	> 0,9	=0,8305
L+Depo+Rem	0,281 \pm 0,09368	> 0,9	> 0,9
Depo	0,3747 \pm 0,0955	> 0,9	=0,865

Kontrole karşı % değişim	L grubuna karşı % değişim
58	
46	79
98	168
72	123
96	164

4.6.2. TNF- α ELISA



Şekil 4.6.b. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda alınan kan plazmasından ELISA yöntemi ile ölçülen TNF- α miktarı (pg/ml). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmesi de L grubunda tespit edilen TNF- α miktarı kontrol grubuna göre iki kat, diğer gruplara göre ise daha yüksek oranda fazla görülmüştür (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$).

Tablo 4.6.b. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda alınan kan plazmasından ELISA yöntemi ile ölçülen TNF- α miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 olarak ifade edilmiştir. F=5,673)

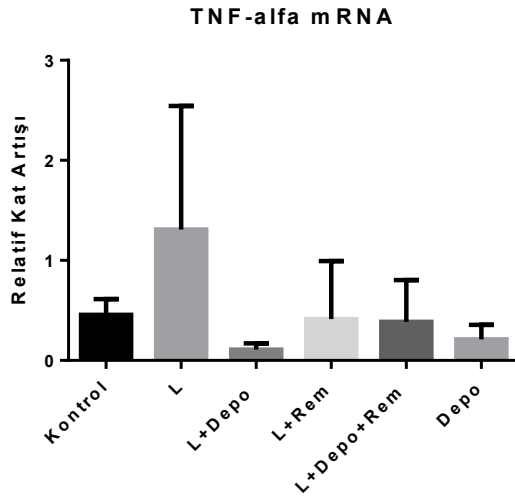
TNF- α ELISA (pg/ml)					
	Median	%25	%75	Kontrolle karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	45,95	26,54	53,67		
L-NAME	110,7	102,6	127,7	> 0,9	
L+Depo	17,15	12,81	36,89	> 0,9	=0,1081
L+Rem	18,18	13,12	59,64	> 0,9	=0,2435
L+Depo+Rem	17,28	8,425	61,89	> 0,9	=0,1623
Depo	39,35	12,33	79,52	> 0,9	=0,6945

Kontrolle karşı % değişim	L grubuna karşı % değişim
%270	
%53	%20
%78	%29
%69	%26
%104	%38

4.7. PCR Sonuçları

TNF- α mRNA düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark göstermemektedir. Bununla birlikte L grubunda artan TNF- α mRNA miktarının tedavi gruplarında kontrol seviyesine düştüğü gözlenmektedir. TNF- α reseptörleri açısından R1 gruplar arasında herhangi bir farklılık göstermezken R2 Depo tedavisi gören gruplarda artmış ve bu artış L-NAME ile birlikte Depo verilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. Epo reseptörü açısından ise mRNA miktarları gruplar arasında istatistiksel bir farklılık göstermezken Depo tedavisi gören gruplarda hafifçe azaldığı görülmektedir (Şekil 4.7.a., 4.7.b., 4.7.c., 4.7.d.; Tablo 4.7.a., 4.7.b., 4.7.c., 4.7.d.).

4.7.1. TNF- α PCR



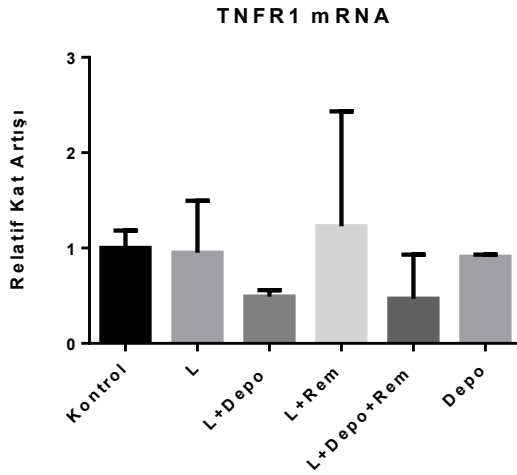
Şekil 4.7.a. SF verilen kontrol grubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda sağ böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen TNF- α mRNA miktarı (relatif kat artışı). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmesi de L-NAME verilen grupta tespit edilen TNF- α mRNA miktarı kontrol grubuna göre iki kat diğer gruplara göre ise daha da fazla artmıştır (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10).

Tablo 4.7.a. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen TNF- α mRNA miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları (Gruplar Kruskall-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25,%75 olarak ifade edilmiştir. F=3,212).

TNF- α mRNA (relatif kat artışı)					
	Median	%25	%75	Kontrolle karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	0,3369	0,1231	0,887		
L-NAME	0,6951	0,1312	2,571	> 0,9	
L+Depo	0,0793	0,0671	0,1693	> 0,9	=0,2768
L+Rem	0,0564	0,0289	1,117	> 0,9	=0,3911
L+Depo+Rem	0,1333	0,0684	0,9503	> 0,9	> 0,9
Depo	0,1931	0,0747	0,3691	> 0,9	> 0,9

Kontrolle karşı % değişim	L'ye karşı % değişim
%286	
%24	%8
%91	%32
%85	%30
%46	%16

4.7.2. TNFR1 PCR



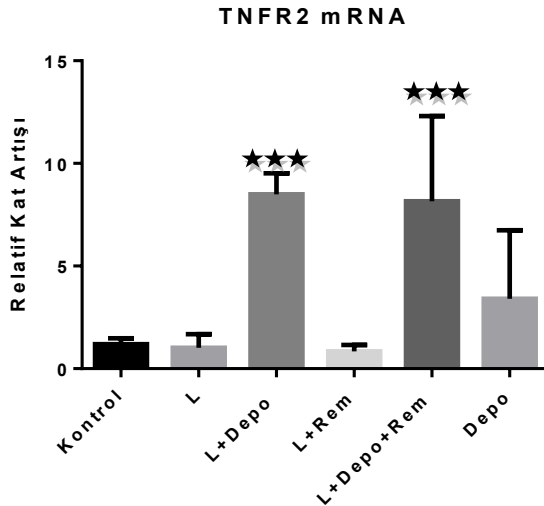
Şekil 4.7.b. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen TNFR1 mRNA miktarı (relatif kat artışı). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmesi de L-NAME ile birlikte Depo verilen L+Depo ve L+Depo+Rem gruplarında TNFR1 miktarı yarı yarıya azalmıştır (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10).

Tablo 4.7.b. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen TNFR1 mRNA miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar Kruskal-Wallis ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Dunn testi ile yapılmıştır. Değerler median, %25, %75 olarak ifade edilmiştir. F=0,9637)

TNFR1 mRNA (relatif kat artışı)					
	Median	%25	%75	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri
Kontrol	0,9083	0,5481	1,394		
L-NAME	0,9261	0,5342	1,382	> 0,9	
L+Depo	0,4772	0,4341	0,565	> 0,9	> 0,9
L+Rem	0,5907	0,5683	2,206	> 0,9	> 0,9
L+Depo+Rem	0,3487	0,1895	0,808	=0,4516	> 0,9
Depo	0,9174	0,8866	0,9252	> 0,9	> 0,9

Kontrole karşı % değişim	L'ye karşı % değişim
%95	
%49	%52
%123	%129
%47	%49
%91	%96

4.7.3. TNFR2 PCR

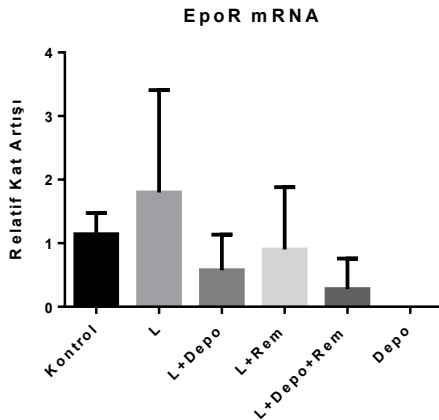


Şekil 4.7.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda deney sonunda sağ böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen TNFR2 mRNA miktarı (relatif kat artışı). L-NAME ile birlikte Depo verilen L+Depo ve L+Depo+Rem gruplarında TNFR2 ifadenmesi anlamlı derecede artmıştır. Depo'nun tek başına verildiği Depo grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da TNFR2 kontrole göre 3 kat artmıştır (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, n=10, ***p<0,001).

Tablo 4.7.c. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen TNF- α R1 mRNA miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm SEM$ ve $p < 0,05$ anlamlı farklılık olarak ifade edilmiştir. $F=16,5$)

TNFR2 mRNA (relatif kat artışı)					
	$\bar{x} \pm SEM$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri	Kontrole karşı % değişim	L 'ye karşı % değişim
Kontrol	1,194 \pm 0,2908				
L-NAME	1,014 \pm 0,2735	> 0,9		%85	
L+Depo	8,499 \pm 0,5887	< 0,001***	< 0,001***	%712	%838
L+Rem	0,8392 \pm 0,1281	> 0,9	> 0,9	%70	%83
L+Depo+Rem	8,153 \pm 2,4	< 0,001***	< 0,001***	%683	%804
Depo	3,404 \pm 1,929	=0,451	=0,3933	%285	%336

4.7.4. EpoR PCR



Şekil 4.7.d. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen EpoR mRNA miktarı (relatif kat artışı). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmesi de Depo verilen tüm gruplarda epo reseptör mRNA ifadenmesi oldukça azalmış, Depo'nun tek başına verildiği Depo grubunda bu azalma PCR tekniği ile tespit edilebilecek en alt seviyelere kadar düşmüştür (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir, $n=10$).

Tablo 4.7.d. SF verilen kontrol gurubuna göre L-NAME tek başına verilen, L-NAME ile birlikte Depo verilen, L-NAME ile birlikte Rem verilen, L-NAME ile birlikte hem Depo hem de Rem verilen ya da Depo tek başına verilen dişi yetişkin sıçanlarda sağ böbrek dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen EpoR mRNA miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. (Gruplar One Way Anova ile analiz edilmiş sonrasında gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Tukey testi ile yapılmıştır. Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak ifade edilmiştir. F= 1,72).

EpoR mRNA (relatif kat artışı)					
	$\bar{x} \pm SEM$	Kontrole karşı p değerleri	L'ye karşı p değerleri	Kontrole karşı % değişim	L'ye karşı % değişim
Kontrol	1,142±0,3321				
L-NAME	1,799±0,6087	=0,8534		%158	
L+Depo	0,5758±0,3225	> 0,9	=0,5673	%50	%32
L+Rem	0,9002±0,4005	> 0,9	=0,6577	%79	%50
L+Depo+Rem	0,2791±0,2764	=0,8445	=0,3376	%24	%16
Depo	0,000869±0,000247	=0,6358	=0,1820	%0,07	%0,04

5. TARTIŞMA

Yapılan yoğun araştırmalara rağmen hipertansiyon hastalarının %95'inden fazla olan esansiyel hipertansiyona bağlı yaygın doku hasarlarını önlemek halen hipertansiyon tedavi kliniklerinin çözmeye çalıştığı önemli problemlerden biridir. Kliniklerde esansiyel hipertansiyonda yaygın olarak kullanılan doku koruyucu çeşitli tedavi protokolleri çok başarılı değildir ve birçok istenmeyen yan etkilere sahiptir. Bütün dünyada ölümlerin ve sakatlıkların birinci nedeni olarak öne sürülen hipertansiyonun tedavisinde bulunacak mekanizmalar ve tedavi edici ilaçların keşfi büyük önem arz etmektedir. Hipertansiyona bağlı doku hasarından ileri derecede etkilenen organlardan biri de böbrekler ve renal sistemdir. Böbrek fonksiyon bozuklukları hipertansiyona bağlı doku hasarlarında en sık karşılaşılan ve ciddi problemlere yol açan bir durumdur. Yaygın doku hasarı ve apoptozise yol açan olaylara inflamasyona bağlı TNF- α seviyelerinde artış eşlik eder. L-NAME verilerek sıçanlarda oluşturulan kronik hipertansiyonda ortaya çıkan böbrek dokusu hasarı (apoptozis), artan TNF- α aktivitesine bağlı olarak kritik doku koruyucu seviyelerinin altına düşen endojen Epo yetersizliğindedir. Epo'nun hematopoetik etkisi çok düşük konsantrasyonlarda bile gerçekleşirken, doku koruyucu etkisi Epo'ya daha düşük affiniteli bir sitokin reseptörü ile Epo reseptörü arasında heterodimerik bir bağlantı yolağının aktivasyonunu gerektirmektedir. Böbrek dokusunun fizyolojik koşullarda fonksiyonlarının sürdürülebilmesi doku koruyucu ve hematopoetik etki seviyelerinin üzerinde Epo varlığına bağlıdır. Böbrek dokusunda üretildiği için böbreklerde doku koruyucu düzeyinde Epo sağlanabilirken kan yoluyla kemik iliğine ulaşabilen pikomolar seviyelerine düşmüş Epo hematopoietik etki için yeterli olabilmektedir. Çalışmamız Epo'nun %90'ının sentezlendiği ve hipertansiyonda en önemli organlardan bir olan böbreklerde Epo'nun doku koruyucu etkilerini açıklamaya çalışırken Epo'nun neden böbreklerden salgılandığı sorusuna da yeni bir yaklaşım geliştirmiştir. Hipertansiyonda yükseldiği bilinen, önemli bir proinflamatif ajan olan TNF- α ve reseptörlerini, TNF- α 'nın inflamasyon bölgelerinde artmasını sağlayan makrofaj hücrelerini, hücre içinde farklı etkiler gösteren pek çok proteinin transkripsiyonunu sağlayan NfKappaB'yi ve dokudaki apoptozis miktarını, Epo'nun doku koruyucu etkileri tartışabilmek üzere araştırdık.

Çalışmamızın sonuçlarına göre 4 hafta 20 mg/kg/gün ip injekte edilen L-NAME ile oluşturulan kronik hipertansiyonlu yetişkin SD dişi sıçanlarda, arteriyel kan basıncı parametrelerini ve kan hücre değerlerini etkilemeyen 0,25 μ g /kg/ üç günde bir ve dört hafta ip verilmesi renal doku hasarlarını engellemiştir.

Uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir protein olan Epo'nun sıçanlarda değişik süre ve modellerde kullanılan dozları konusunda yeterli sayıda literatür olsa da daha yeni bir Epo analogu olan Depo için aynı şeyi

söylemek mümkün değildir. Lipsic E ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada iki ayrı grupta 40 µg/kg ve 0,4 µg/kg dozunda Depo 3 haftada 1 doz kullanılarak 9 haftalık süreçte miyokardiyal infarktüse karşı koruyucu etkileri araştırılmış ve hematokrit seviyesinin yüksek kullanılan dozda 4. haftada yükseldiği gözlenmiştir. Çalışmamız açısından kan parametrelerini değiştirmeyen en yüksek dozu bulmamız önem arz etmektedir. Bu açıdan Lipsic E. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın verileriyle birlikte, 10 µg/kg dozundan başlayarak 5 farklı Depo dozunda (10 µg/kg, 2,5 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,1 µg/kg) L-NAME ile birlikte yaşam sürelerini inceledik. L-NAME ile birlikte verilen en yüksek iki doz grubunda (10 µg/kg, 2,5 µg/kg) hematokrit seviyeleri onuncu günde çok yükselmiş ve bu gruptaki sıçanlar yaşayamamıştır. Çalışmamız sonucunda, denenen dozlardan, yaşam süreleri sadece L-NAME verilen gruba göre farklı olmayan 3 doza (0,5 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,1 µg/kg) ulaştık (şekil 4.1.) (Lipsic, 2006).

Epo'nun eritropoetik etkilerinin doza ve zamana bağlı sonuçları konusunda pek çok bilgi vardır. Bullard A.J.ve Yellon D. M.'nin yaptıkları bir çalışmada 5000 IU/kg dozunda Epo, sıçanlara üç hafta boyunca haftada tek doz verildiğinde hematokrit artmıştır ve aynı doz üç hafta boyunca haftada üç doz olarak verildiğinde ise daha da çok artmıştır. Wang L. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise sıçanlara 5000 IU/kg ile 10000 IU/kg dozunda Epo 7 gün boyunca verilmiş, verildiği süre boyunca ve sonraki 7 gün boyunca hematokrit değerleri anlamlı derecede artmış, 14. günde yüksek doz Epo'nun düşük doza göre de anlamlı derece hematokrit seviyesini yükselttiği görülmüştür. Frenay A.R. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, spontan hipertansif rat modeli ve Sprague Dawley ratları kullanılmıştır, bizim de çalışmamızda kullandığımız Darbepoetin-α 40 µg/kg dozunda 9 hafta boyunca 3 haftada bir doz, toplam üç doz olarak kullanılmıştır. Spontan hipertansif sıçanlarda hematokrit ve hemoglobin değerlerinde bir değişiklik olmazken Sprague Dawley sıçanlarında bu değerlerin anlamlı derece yükseldiği gözlenmiştir. Gao E. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise sıçanlara 2, 7, 11 ve 30 µg/kg dozunda Darbepoetin-α verilmiş, 72 saatin sonunda 11 ve 30 µg/kg dozlarında hematokrit seviyesinin arttığı gözlenmiştir (Erhe, 2007; Frenay, 2012; L. Wang, Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., Chopp, M., 2004).

L-NAME'nin kan parameterleri üzerine etkisi hakkında MacKendrick W. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada sıçanlarda yükselen hematokrit değerinin L-NAME'nin dozuna bağlı bir cevap olduğunu öne sürülmüştür. Iadecola C. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise 96 saat sonunda NO blokajının hematokrit seviyesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Yaptığımız literatür araştırmasında L-NAME'nin ya da daha genel NO blokajının hematokrit değeri, eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı değerlerini baskılayıcı etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Kan parametrelerini değiştirmeyen en yüksek dozu tespit etmek için yaptığımız çalışmada denediğimiz 3 doz içinde L-NAME ile birlikte kullanıldığında 0,5 µg/kg eritrosit miktarını, hematokrit değerini ve hemoglobin miktarını artırmıştır. 0,25 µg/kg dozu ise hiçbir parametrede herhangi bir değişiklik yapmayarak kan parametrelerini değiştirmeyen en yüksek Darbepoetin-α dozu olarak tespit edilmiştir. 0,25 µg/kg Darbepoetin-α dozu çalışmamızın geri kalanında tedavi dozu olarak kullanılmıştır. Ayrıca bu bilgi literatür için de yeni bir bilgi olması nedeniyle önemlidir (şekil 4.2.a., 4.2.b., 4.2.c.).

Morley J.E. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma ile NO'nun merkezi sinir sisteminde iştahı kontrol eden temel bileşenlerden biri olduğu iddia edilmiştir. Bu iddiayı kanıtlar şekilde NO'nun periton içi ya da oral yolla verilen L-NAME ile blokajı sonucunda sıçanlarda ve farelerde ağırlık kayıpları görülmüştür. Soszynski D.'nin yaptığı bir çalışmada, LPS ile septisemi modeli oluşturulan sıçanlarda L-NAME'nin ağırlık üzerine kontrol grubundan farklı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu da NO'nun ağırlık kaybettiren etkisinin başlangıç ağırlığına ve doza bağlı bir etki olabileceğini düşündürmektedir. Soszynski D. 'nin kullandığı sıçanlar 270-350 gram arasındadır, bu haliyle ağırlıkta düşüş görülen çalışmalara göre yüksek bir başlangıç ağırlığıdır ve doz (50 mg/kg ip) başka çalışmalarda ağırlık kaybına neden olan dozla aynıdır (Morley, 2011; Soszynski, 2002).

Epo'nun ağırlık üzerine etkisinin literatürde farklı sonuçlara işaret etmesi Epo'nun bu etkisinin doza, sreye ve cinsiyete bağlı olduğunu göstermektedir. Fatouros M. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Epo verilen gruplardaki sıçanlar 12 günün sonunda diğerlerine göre anlamlı derecede ağırlık kazanmıştır. Bu alışma da kullanılan günlük 500 IU/kg dozundaki rHuEpo hematokrit seviyesinide yükseltmiştir. Eshraghi-Jazi F. ve arkadaşlarının yaptığı 8 günlük çalışmada ise sıçanlar Epo ile birlikte kullanılan ilaçtan bağımsız olarak kilo vermiş ancak bu çalışmada son günlere doğru dişi sıçanların kilo verme hızlarında bir azalma gözlenmiştir. Odelia K. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise eritropoetini yoğun sentezleyen bir sıçan modeli diğer sıçanlara göre daha fazla yem tktmiş ve daha çok ağırlık kazanmıştır (Fatouros, 1999; Jazi, 2013; Odelia, 2010).

Epo'nun ağırlık üzerine olan etkilerinin tersine TNF-α'nın ölçüldüğü ya da bloke edildiği benzer çalışmalarda göstermiştir ki TNF-α ağırlık kaybına, aynı anlama gelmek üzere blokajı ağırlık kazanılmasına sebep olmaktadır (Kouhata, 2001; Krügel, 2013).

Çalışmamızda Epo'nun ya da infliximabın L-NAME ile birlikte verildiğinde sıçan ağırlıkları üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmaması bu maddelerin NO blokajından kaynaklı ağırlık kaybını dengelemeleri sayesinde olduğu şeklinde değerlendirilebilir. Depo grubunda Darbepoetin-α'nın yalnız başına verildiğinde ağırlık artışına neden olması bu görüşü desteklemektedir (şekil 4.3.a., 4.3.b., 4.3.c.).

L-NAME daha önce yapılan çalışmalarda da uygun olarak kan basıncını anlamlı derecede yükseltmiş ve hipertansiyona neden olmuştur. Epo'nun kardiyovasküler sistem üzerine en önemli etkisi kan basıncını yükseltmesi ve hipertansiyona neden olmasıdır. Epo'nun bu etkisi, anemi tedavi edici dozunda uzun süreli kullanıma bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Meziri F. ve arkadaşlarının yaptığı ve sıçanlarda L-NAME ile oluşturulan hipertansiyon modelinde Epo'nun (100 U/kg rHuEPO) kan basıncını yükselttiği ve bu etkinin egzersiz ile daha da arttığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada Epo'nun mezenterik arterde asetilkoline karşı gevşeme ve vazodilatasyon cevaplarını azalttığı görülmüştür. Ruschitzka F.R. ve arkadaşlarının Epo'yu aşırı ifade eden transgenik fare modelinde L-NAME verilmesi üzerine sekiz fareden üçü ölüyor ve geri kalanlarda ise L-NAME'nin hipertansif etkilerine karşı bir etki gözlenmiyor. Her iki çalışmada da hematolojik parametrelerde bir değişim olduğu gözlenmiştir. Hematolojik parametrelerde değişikliğe neden olmayan bir doz aralığında Epo'nun kan basıncına etkisini görebileceğimiz herhangi bir çalışmaya literatürde henüz rastlanmamıştır. Çalışmamızda kullandığımız doz olan 0,25 µg/kg Darbepoetin-α L-NAME ile gelişen hipertansiyona karşı herhangi bir etki göstermemiştir. Deneyimizde Darbepoetin-α'nın tek başına kullanıldığı Depo grubunda kontrole karşı hafif bir yükselme gözlenirse de bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışmamızın ortaya çıkardığı sonuca göre kullandığımız Depo dozu kan basıncı parametrelerine herhangi bir etkide bulunmamıştır ve bu durum Epo'nun kan basıncını yükselten etkisinin doza bağımlı bir etki olduğu sonucunu göstermektedir (Meziri, 2011; Ruschitzka, 2000) (Şekil 4.4.a., 4.4.b., 4.4.c.).

Epo'nun kardiyovasküler sistem üzerindeki koruyucu etkileri üzerine yapılan pek çok çalışmada kalp hızları ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmiştir. Parsa C.J ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, miyokardiyal İ/R yapılan tavşanlarda Epo uygulaması kalp hızında hafif bir düşüşe neden olsa da bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir. Mancini D.M. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da Epo uygulamasının sıçanlarda aynı şekilde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüşe neden olduğu belirtilmiştir. Van der Meer P. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise sıçanlarda Epo uygulaması kalp hızını hafifçe düşürmüştü fakat bu düşüşte istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Literatürde geçen çalışmalarla karşılaştırdığımızda, bizim çalışmamızda Depo'nun kalp hızını istatistiksel olarak anlamlı derece düşürmesinin, uygulanan dozun süresine bağlı olduğunu söyleyebiliriz. Diğer çalışmalarda kalp hızında bir eğilim olarak görülen düşüş bizim çalışmamızın 30 gün süren kronik modelinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşmıştır. Epo'nun ya da Depo'nun kalp miyositleri üzerine olan koruyucu etkisini gösteren başka çalışmaların sonuçlarına bakarak, Depo'nun bu etkisinin kalbin kontraksiyon gücünde bir artışa ve dolayısıyla kalp hızında bir düşüşe neden olduğunu söyleyebiliriz. (Mancini et al., 2003; Parsa et al., 2004; van der Meer et al., 2005).

Hipertansiyonda yükselen AnjiyotensinII, aldosteron ve mekanik stress Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) artması neden olur. ROS'ların neden olduğu endotelial hasar sonucunda dolaşımdaki lipoproteinler subendotelial bölgeye girebilmekte ve burada okside olabilmektedir. Bunun sonucunda ise T hücrelerinde bulunan Toll Like Reseptör 4 (TLR4) uyarılır ve T hücrelerinden interferonlar salgılanır. Salgılanan interferonlar makrofajların aktive olmasını ve dokuda birikmesini sağlar. Bu yolla artan TNF- α dokuda inflamasyona ve apoptozla şekillenen bir doku hasarına neden olur. Tübüler hasarın belirtisi; renal hasarın histolojik skoru ile belirlenir. Morfolojik kriterler ve TUNEL yöntemi ile belirlenen tübüler epiteliyal hücrelerin ölümü; nekroz ve apoptozun bir kombinasyonu şeklinde karşımıza çıkar. L-NAME ile oluşturduğumuz hipertansiyon modelinde ortaya çıkan doku hasarı apoptozisi DNA kırıklarını boyayarak tespit eden TUNEL yöntemine göre L-NAME'nin sebep olduğu apoptozis tüm tedavi gruplarında engellenmiştir. Literatürde Depo'nun doku koruyucu etkisini TUNEL yöntemiyle gösteren bir makale bulunmamasına rağmen Epo ile yapılan çalışmalar mevcuttur ve bu çalışmalarda da Epo'nun apoptotik indeksi düşürdüğü gözlenmiştir. TUNEL verileri, çalışmamızın, hem Epo hem de Remicade tedavisi sonucunda, L-NAME ile oluşturulan hipertansiyon modelinde ortaya çıkan doku hasarını engellediğini göstermiştir. (Şekil 4.5.d, 4.5.e.; Tablo 4.5.a.). (Krügel, 2013; Pinto, 1998; Suzuki, 2002)

Hem hipertansiyonlu hastalarda hem de hipertansiyon modeli ile yapılan deneysel çalışmalarda kronik olarak kan basıncının yükselmesinin inflamasyona neden olduğu ve hipertansiyonda ortaya çıkan çoklu organ hasarının temel sebebinin inflamasyon olduğu literatürde gösterilmiştir. Gonzalez J. F. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sol ventrikül kalınlaşması olan hipertansiyon hastalarının idrarlarında, yüksek miktarda tespit edilen TNF- α , hipertansiyonda böbreklerden yoğun miktarda TNF- α sentezlendiği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Dörffel Y. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise hipertansiyonlu hastalardan izole edilen monositlerin sağlıklı bireylerden izole edilenlere göre LPS uyarımına karşı çok daha yoğun TNF- α sentezlediği gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da ELISA ile ölçülen plazma TNF- α miktarı ve PCR ile ölçülen TNF- α mRNA miktarı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da katlı olarak yüksek çıkmıştır. Hipertansiyonun inflamasyon kaynaklı apoptoza neden olan mekanizması ile birlikte düşünüldüğünde, tek başına L-NAME verilen grupta apoptotik indeksin yüksek olmasının, kronik yüksek kan basıncına bağlı olduğunu söyleyebilmekteyiz (Dörffel, 1999; Navarro-Gonzales, 2008).

Bir hipertansiyon modeli olarak L-NAME ile vücudun major vazodilatörü olan NO'yu bloke etmemizin ortaya çıkan doku hasarına katkısının inflamasyonun katkısını perdeleyecek düzeyde olup olmadığı önemlidir. NO mikrodolaşımda kılcal damarlarında gevşemesini sağlayarak doku perfüzyonunu artırarak ve inflamasyonu düzenleyerek doku korumasına katıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte NO, süperoksit (O_2^-) ile reaksiyona girerek vücut savunmasında sitotoksik etkisi olan

peroksinitritin oluşumuna neden olur ve makrofajlardan salgılanan yoğun miktardaki NO'nun bu şekilde doku hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Wang C. N. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada endotoksemi esnasında makrofajlardan ve endotel hücrelerinden aşırı salgılanan NO'nun adrenokortikal hücrelerde mitokondriyal oksidatif strese ve adrenal yetersizliğe neden olduğu bildirilmiştir. NO'nun bu çok yönlü etkilerinin blokajı ile ortadan kaldırılması, hipertansiyonda ortaya çıkan doku hasarına odaklanan bizim çalışmamız açısından doğru bir yaklaşım sunmaktadır. Bu sayede L-NAME ile oluşturduğumuz hipertansiyonda ortaya çıkan doku hasarının NO kaynaklı değil, inflamasyon kaynaklı olduğunu ileri sürebilmekteyiz (Radi, 2001; C. N. Wang, Duan, G.L., Liu, Y.J., Yu, Q., Tang, X.L., Zhao, W., Li, X.H., Zhu, X.Y., Ni, X., 2015).

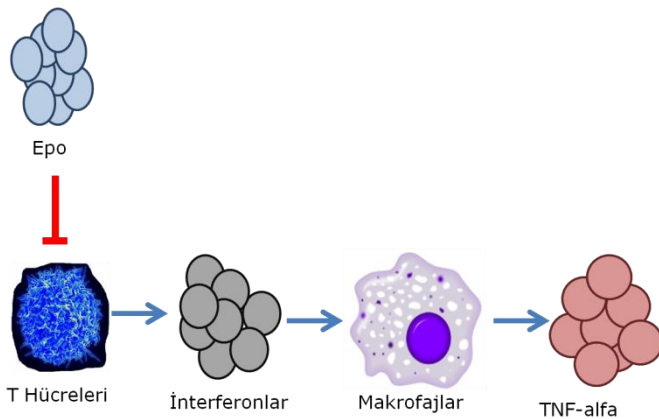
EpoR mRNA seviyesinin Depo verilen tüm gruplarda katlı olarak azalmasının nedeni, ekzojen olarak verilen Depo'nun EpoR'yi downregülasyona uğratmış olmasıdır. Bununla birlikte Depo grubunda EpoR tespit edilebilecek en alt düzeyde çıkmasına rağmen bu grupta kan parametrelerini yükseltmiş olmasına dayanarak söyleyebiliriz ki, EpoR downregüle olmasına rağmen işlevsel düzeyde halen bulunmaktadır.

ELISA yöntemiyle ölçülen plazma Epo miktarı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte tek başına Depo verilen grup ile kontrol grubu değerlerinin %96 düzeyinde benzerlik göstermesi kullanılan kit üzerinde soru işaretleri ortaya çıkarmıştır. Her ne kadar Darbepoetin- α ile Epo önemli miktarda homoloji gösterse de kullandığımız kit Darbepoetin- α 'ya karşı hassas olmayabilir. Bu durum kitin üreticisi firma tarafından da bilinmemektedir. Yine de kan plazmasından ELISA ile ölçtüğümüz Epo miktarının L grubunda kontrole göre yarı yarıya düşmüş olması yine ELISA ile ölçülen plazma TNF- α miktarının ve PCR ile ölçülen TNF- α mRNA miktarının artışı ile ilgilidir. Hipertansiyona cevap olarak oluşan inflamasyonda artan TNF- α endojen Epo sentezi baskılamıştır. TNF- α 'yı Remicade ile blokladığımız L+Rem grubunda plazma Epo seviyesinin tekrar kontrol grubu düzeyine yükselmesi de bu görüşümüzü desteklemektedir.

Epo'nun doku koruyucu etkisi hakkında süren tartışmalarda önemli nokta, hematopoetik olmayan dokularda Epo'nun ve reseptörünün mRNA'sı bulunmasına rağmen protein olarak varlığının güvenilir yöntemlerle tespit edilememiş olmasıdır. Jelkmann ve Elliot'ın 2013 tarihli derlemesinde Epo ve reseptörünün tayininde kullanılan antikolar üzerinden yapılan çalışmaların güvenilirliği tartışılmıştır. Benzer bir sonuç Ali-Hassan-Sayegh S. ve arkadaşlarının yaptıkları 2014 tarihli bir meta analizde MI hastalarına verilen düşük doz Epo'nun herhangi bir etkisinin olmadığı savunulurken yüksek doz Epo'nun bir etkisinin olabileceği bir savunulmuştur. Buna karşın Gholamzadeh A. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Epo tedavisinin MI sonrası aritmileri azalttığı öne sürülmüştür. Jun J. H. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise Epo hipoglisemik sıçanlarda oluşturulan miyokardiyal iskemi-reperfüzyon

modelinde apoptotik hücre sayısını anlamlı derecede azaltmıştır (Ali-Hassan-Sayegh, 2015; Gholamzadeh, 2015; W. Jelkmann, Elliot, S., 2013; Jun, 2014).

Klasik bilgiye göre makrofajların aktivasyonu çoğunlukla T hücrelerinden sentezlenen interferonlar aracılığıyla gerçekleşir. Aktive olan makrofajlar TNF- α 'nın en önemli kaynağıdır. Cravedi P. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Epo'nun T hücrelerinin proliferasyonunu baskılayarak immun yanıtın oluşumunu engellediğini göstermişler ve böbrek transplantasyonunda Epo'nun koruyucu rolünün bu yolla gerçekleştiğini iddia etmişlerdir. Kan sayım sonuçlarına göre lenfositlerde gruplar arasında herhangi bir farklılık tespit edememiş olsak da ED-1 boyaması ile tespit ettiğimiz makrofaj birikimi sonuçlarına göre L grubunda ve L+Rem grubunda makrofaj birikmesinin kontrol grubuna göre daha yoğun olduğunu gözlemekteyiz. Aynı zamanda TNF- α 'nın miktarını belirlediğimiz ELISA sonuçlarına göre L grubunda TNF- α miktarının arttığını tespit ettik ve PCR tekniği ile ölçtüğümüz TNF- α mRNA miktarı da bu sonuçları desteklemektedir. L-NAME ile oluşturulan hipertansiyon modeli makrofaj hücrelerinin böbrek dokusunda birikmesi ile TNF- α miktarını artırmakta, Darbepoetin tedavisi ise makrofaj birikimini ve aktivasyonunu engelleyerek anti-inflamatif bir etki göstermekte ve TNF- α miktarını kontrol seviyesine çekmektedir. Darbepoetin-anın bu etkisi Remicade ile birlikte uygulandığı L+Depo+Rem grubunda da gözlenmekte fakat L-NAME ile remicade verilen L+Rem grubunda makrofaj hücre birikimi gözlenmektedir. Depo'nun kullanılmadığı L+Rem grubunda gözlenen birikim Remicade'ın doğrudan TNF- α üzerine etki etmesi ve makrofajlar üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmamasıyla ilişkilidir. Bununla birlikte bir TNF- α antikoru olan Remicade'ın beklendiği gibi bu grupta da TNF- α miktarını protein düzeyinde düşürmüştür. (Şekil 4.5.f., 4.6.b., 4.7.a.). (Daniel P. Stites, 1991; Roitt, 1986)



Şekil 5.1. İnflamasyonda görev alan T hücreleri salgıladıkları interferonlarla makrofajların aktive olmasını sağlar. Aktive olan makrofajlar TNF- α 'nın en önemli kaynağıdır. Yapılan çalışmalar Epo'nun T hücrelerinin proliferasyonunu baskıladıklarını göstermiştir (orijinal çizim).

Makrofajların aktivasyonunun Depo ile engellenmesinin yanında ED-1 ile tespit ettiğimiz makrofaj birikimi, dolaşımdaki monositlerin çeşitli uyarılarla dokuya geçmesi (kemotaksi) ve doku makrofajlarına dönüşmesi anlamına gelen karmaşık bir mekanizmayı da gündeme getiriyor. Monositlerin dolaşımdan çıkıp iskelet değiştirerek makrofaj haline geçmesini lökotrienler, komplemet faktörleri ve çeşitli kemokinler uyarır. Wang J. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada streptozotocin ile diyabet oluşturulan sıçanların aortalarında, hematopoetik etkinin altındaki dozda kullanılan Epo, diyabetle birlikte ifadelenmesi artan çeşitli adhezyon moleküllerinin ifadelenmesini baskılayarak makrofaj birikimini engellemiştir. Villa P. ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada ise beyin I/R modelinde Epo, monositlerin kemataksisini dolayısı ile doku makrofajlarına dönüşümünü uyaran önemli bir sitokin olan monosit kemoatraktant protein-1'i (MCP-1) baskılayarak anti-inflamatif bir etki göstermiştir. Epo'nun makrofajlar la olan etkileşimi üzerinde çalışılmayı gerektiren bir konudur. Çalışmamız bir hipertansiyon modelinde, böbrek dokusunda Epo'nun makrofaj birikimini engellediğini ilk defa göstermiştir(G.E., 2000; Pia Villa, 2003; j. Wang, Toba, H., Morita, Y., Nakashima, K., Noda, K., Tian, W., Kobara, M., Nakata, T., 2013).

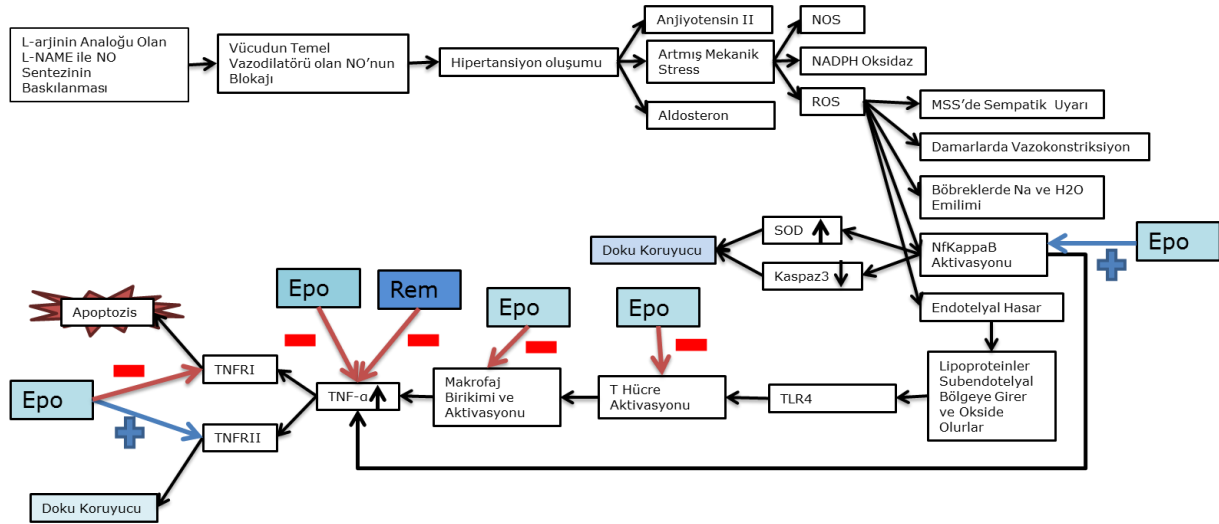
NfKappaB; pleitropik bir transkripsiyon faktörü olup; apoptoz, hücre yaşamı ve büyümesi, innate immunité, hücre sel farklılaşma ve stress, hipoksi ve iskemiye karşı hücre sel yanıtın düzenlenmesinde etkilidir. NfKappaB aktivasyonu; hipertansiyonun erken döneminde başlar, immun hücre infiltrasyonunu baskılar ve hipertansiyonun önlenmesine yardımcı olur. Bu durum; hipertansiyonun patogenezinde önemli bir yer tutar. Oksidatif stres; apoptoz ve NfKappaB aktivasyonunu uyarır. NfKappaB; hasarlı böbrekte belirgin olarak artar. Hipertansiyon, NfKappaB düzeyini artırır. Yüksek NfKappaB, yoğun apoptozun bir sonucudur. Hücre apoptoza girdiğinde; yeni proteinleri sentezleme yeteneğini de kaybeder. NfKappaB'nin antiapoptotik rolü de gösterilmiştir. NfKappaB'nin hücre ölüm yolağını inhibe/aktive eden dual rolünün, hücre tipi ve uyarana bağlı olarak değişen yollarla yaptığı düşünülmektedir. NfKappaB; antiapoptotik etkiyi, caspase-8'in aktivasyonunu baskılayarak yapar(Iturbe, 2005; Quiroz, 2003; Spandou, 2006; K. S. Wu, Schmid-Schonbein, G.W., 2011).

Epo'nun inflamasyon ve TNF- α üzerine olan etkisi literatürde genel kabul gören bir başlıktır. La Ferla K. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile TNF- α 'nın NfKappaB'nin Epo genini baskılaması yoluyla Epo sentezini azalttığını göstermiştir. Bu etkinin iki yönlü olduğunu gösteren bir başka çalışma Nairz M. ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve izole edilen makrofaj hücrelerinde Epo'nun NfKappaB'yi baskılayarak TNF- α sentezini düşürdüğünü göstermişlerdir. Aynı çalışmada farelerde Epo tedavisinin Salmonella enfeksiyonundaki etkilerine bakılmış ve Epo'nun proinflamatuvar sitokinleri baskılaması sonucu Salmonella hasarının tedavi grubunda kontrole göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Buna karşın Bittorf T. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada EpoR'nin Epo

tarafından uyarılması aynı zamanda proinflamatuvar sitokinlerin sentezinde önemli rolü olan NfKappaB'yi aktive etmiştir ve bu veri çalışmanın yazarları tarafından NfKappaB'nin TNF- α kaynaklı apoptozu engellediği bildirilen başka çalışmalarla açıklanmıştır (Bittroff, 2011; La Ferla, 2002; Nairz, 2011; Van Antwerp, 1998).

NfKappaB'nin literatürde geçen pek çok farklı ve birbirinin tersi sonuçları doğuran fonksiyonları vardır. Bunlardan en çok üzerinde durulan fonksiyonlarından biri TNF- α 'nın sentezinde önemli bir rolü oynamasıdır. L-NAME verilen grupta yüksek tespit edilen NfKappaB ile yine bu grupta yüksek tespit edilen TNF- α mRNA'sı ve plazma protein miktarı arasında ki ilişki bu bilgiyle birlikte değerlendirilebilir. NfKappaB TNF- α sentezini uyararak inflamasyon yanıtına katılsa ve TNF- α kaynaklı apoptozda rol alsada aynı zamanda apoptozu engelleyen bir görevi olduğu bilinmektedir. Depo verilen gruplardaki NfKappaB artışı ise NfKappaB'nin bu ters etkisi ile ilişkilidir. Digicaylıoğlu M. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Epo'nun sinir hücrelerini koruyucu etkisinin NfKappaB aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir. NfKappaB'nin Depo verilen gruplardaki artışı, TUNEL boyaması ile görülen, Depo'nun apoptozu baskılayıcı etkisinin bizim çalışmamızda da NfKappaB aracılığıyla gerçekleşmiş olabileceğini göstermiştir (Digicaylıoğlu, 2001) (Şekil 4.5.h., 4.5.i., 4.7.d.).

TNF- α reseptörlerinden TNFR1, hücre içinde apoptotik mekanizmaları harekete geçirirken TNFR2 koruyucu ve proliferatif bir etki gösterir. Ji, W. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada TNFR2'nin bu etkisinde NfKappaB'nde rol aldığı gösterilmiştir. Kelly, M.L. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise fare kalbinde oluşturulan I/R modeli mezenşimal kök hücre ile tedavi edilmeye çalışılmış, TNFR1 geni susturulmuş farelerden alınan kök hücreler WT farelerden alınan kök hücrelere göre daha iyi bir koruma sağladığı görülmüştür. PCR sonuçlarına göre TNFR1 mRNA düzeyleri, L+Depo ve L+Depo+Rem gruplarında azalmışken TNFR2 mRNA düzeyleri artmıştır. Bu gruplarda NfKappaB'de kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlara göre Darbepoetin α ve Remicade'in doku koruyucu etkisinin TNF- α reseptörlerinin yoğunluğunu TNFR2 lehine değiştirerek ortaya çıkardığını söyleyebiliriz (Ji, 2012; Kelly, 2010). (Şekil 4.7.b., 4.7.c.).

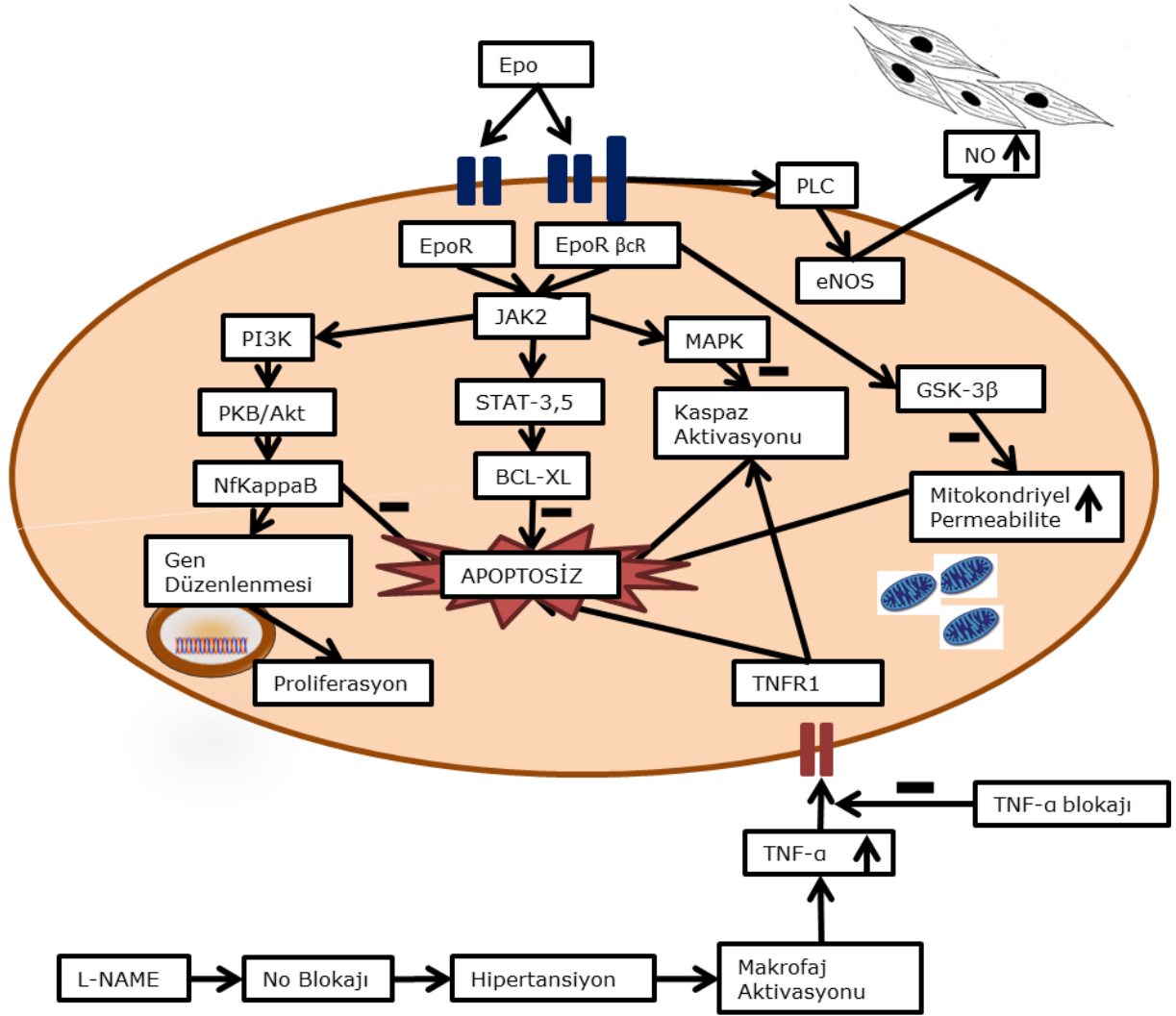


Şekil 5.2. Çalışmamızda bir L-arjinin analogu olan L-NAME ile vücudun temel vazodilatör maddesi olan NO sentezi engellenmiş ve hipertansiyon oluşturulmuştur. Hipertansiyon Anjiyotensin II, Aldosteron ve özellikle artan mekanik stress sonucu ROS ile, NOS ve NADPH oksidaz enzimlerini harekete geçirir. ROS'ların MSS'de sempatik uyarımı artırmak, damarlarda vazokonstriksiyon yapmak, böbreklerde Na ve su emilimini artırmak, NfKappaB aktivasyonu yapmak ve endotelial hasara neden olmak gibi etkileri vardır. Bu etkiler içerisinde hipertansiyon kaynaklı inflamasyonun en büyük nedeni olarak endotelial hasar görülmektedir. Endotelial hasar sonucu subendotelial bölgeye giren lipoproteinler burada okside olurlar ve bu da TLR4 üzerinden T hücre aktivasyonuna neden olur. T hücrelerinden salgılanan interferonlar ise makrofajların aktive olmasına ve inflamasyon bölgesinde birikmesine neden olur ve bunun sonucunda dokuda makrofajlar tarafından sentezlenen TNF- α miktarı artar. TNF- α TNFR1 aracılığıyla apoptoza neden olurken, TNFR2 aracılığıyla doku koruyucu bir etki göstermektedir. TNF- α 'nın hem Epo hem de Remicad ile blokajı ya da Epo'nun NfKappaB aktivasyonu, T hücre inhibisyonu, makrofaj aktivasyonu ve birikiminin engellenmesi, TNF- α reseptörlerinden TNFR1 ifadenmesini inhibe ederken TNFR2 ifadenmesini uyarması yollarıyla doku koruyucu etki göstermiştir.

Bu çalışmada evrimsel olarak çok iyi korunmuş bir pleotropik hormon olan eritropoietin (EPO) analogu olan darbepoietin anın dört hafta süreyle sistemik kan basıncı ve kan hücrelerine etkili olmayan dozunun (0,25 μ gr/kg/üç günde bir) ve Remikadla (5 mg/kg/gün) yapılan TNF- α blokajının, 20 mg/kg/gün L-NAME ile NO blokajı yapılarak oluşturulan kronik hipertansiyonun, sıçan böbrek dokusu hasarı üzerine in vivo etkileri histolojik ve moleküler düzeyde incelenmiştir. Sonuçlarımız dişi yetişkin sıçanlarda, L-NAME ile oluşturulan hipertansiyonu ve kan hücre düzeylerini etkilemeyen Depo tedavisinin, böbrek dokusunda oluşan apoptozisi reseptörü aracılığıyla ve özellikle son yıllarda önemli bir araştırma konusu olan heterodimer doku koruyucu reseptörü β cR üzerinden, ilkönce JAK2'yi aktive ederek ve buradan başlatılan ikincil sinyal yolları; MAPK, PI3K, NfKappaB ve STAT5 aktivasyonu ile gerçekleştirmiş olabilir. Hem bu yolların tetiklediği ikincil sinyal yolları hem de hipertansiyonda doku hasarına neden olan, artmış TNF- α etkisiyle artan kaspazların apoptotik etkileri doğrudan ya da indirekt olarak antiapoptotik proteinlerle engelleyerek doku hasarları korunur. Kaspazlar apoptozisin anahtar

medyatörleridir ve antiapoptotik proteinlerin parçalanmasından sorumludur. Doku koruyucu eritropoietin reseptörü kaspazların aktivasyonu ile en önemli hücre ölümü belirleyicisi olan, mitochondrial permeability transition pore aktive eden glikojen sentaz kinaz 3 beta'yı (GSK3beta) inhibe eder. Eritropoietin aynı zamanda PLC üzerinden kalsiyum kanallarını aktivitesini etkileyerek uyarıcı nörotransmitter salınımını azaltır ve endotel kaynaklı nitrik oksit üretimini artırır. Eritropoietinin diğer anti-apoptotik, BAD, BCL2-bağlantılı ölüm proteini (BCL2-associated death protein); kB nin inhibitörü olan IκB; PKB (Akt), protein kinaz B gibi yollarla da ilgilidir. Literatürde geçen çalışmalara dayanarak çalışmamızda ortaya çıkan doku koruyucu etkinin hücre içi mekanizması bu şekilde açıklanabilmektedir (M. Brines, Cerami, A., 2005).

Çalışmamız literatürde bugüne kadar tam olarak açıklanamamış olan Epo'nun neden böbreklerden salgılandığı sorusuna da yeni bir yaklaşım getirmektedir. Yaşamın hiçbir döneminde hematopoetik görevi olmayan böbrekler Epo'nun %90'ını salgılamaktadır. Uzun süreli kan basıncı düzenlenmesinde yaşamsal önemi olan böbrekler aynı zamanda yüksek kan basıncı kaynaklı ortaya çıkan inflamasyondan etkilenmektedir. Ortaya çıkan inflamasyon Epo sentezini de baskılamaktadır ve bu durum böbrek hasarının derinleşmesine neden olmaktadır. Epo çalışmamızda da gösterdiğimiz gibi böbreği inflamasyon hasarına karşı korumaktadır ve böbreklerde sentezlenmesinin nedeni bu olabilir.



Şekil 5.3. Epo'nun doku koruyucu etkisinin βcR heterodimer reseptörü aracılığıyla gerçekleştirdiğine dair son yıllarda ortaya çıkan önemli çalışmalar bulunmaktadır. Epo hücre içinde reseptörleri aracılığıyla uyardığı JAK2 ve STAT3-5'lerle başlayan mekanizması BCL-XL üzerinden apoptotik proteinlerin baskılanması, MAPK üzerinden Kaspaz aktivasyonunun baskılanması, PI3K, PKB/AKT ve NfKappaB yolağı üzerinden gendüzenlenmesi ile proliferasyonu uyarması yoluyla doku koruyucu etkisini gösterir. Epo βcR üzerinden PLC üzerinden endotelal NO'nun artmasına ve bu yolla mikrodolaşımın artmasını sağlar. Yine βcR üzerinden GSK-3β aracılığıyla mitokondriyel permeabilite artışını baskılar ve bu yolla apoptozu engeller.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu Doktora tez çalışmasında, hipertansiyonda oluşan böbrek hasarının başlıca nedeni olan TNF-alfa'nın blokajı ve TNF-alfa tarafından sentezi baskılanan Epo'nun, L-NAME modeli ile hipertansiyon oluşturulmuş dişi sıçanlarda böbrek dokusu harabiyeti üzerindeki etkileri in-vivo sistemik, moleküler ve histolojik düzeyde araştırılmıştır.

Kan parametrelerini ve tansiyonu etkilemeyen Depo injeksiyonu (0,25 µg/kg/üç günde bir ve 30 gün boyunca), L-NAME ile oluşturulmuş kronik hipertansiyonda böbrekte oluşan apoptozisi engellemiştir. Bulgularımız Depo'nun bu etkisini makrofaj birikimini engelleyerek, apoptotik plazma TNF-alfa seviyesini ve TNF-alfa mRNA düzeyini ve TNFR1 reseptörünü azaltarak fakat antiapoptotik TNFR2 ifadenmesini uyararak gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Sunulan çalışmanın sonuçları ve son yıllarda yayınlanan çalışmaların ışığında, vücutta yaşamın hiçbir evresinde hematopoetik bir organ olmasa da majör Epo üreticisi böbrek dokusu ile Epo arasında şu hipotezi ileri sürüyoruz: L-NAME verilerek sıçanlarda oluşturulan kronik hipertansiyonda ortaya çıkan böbrek dokusu hasarı (apoptozis), hipertansiyonda artan TNF-alfa aktivitesine bağlı olarak, kritik doku koruyucu seviyelerinin altına düşen endojen Epo yetersizliğindedir. Bu hipotez Epo'nun neden böbreklerden salgılandığı tartışmasına yeni bir yaklaşım getirmektedir.

Ayrıca, bu tez çalışmasıyla Darbepoetin-a'nın sıçanlarda 10 µg/kg, 2,5 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,25 µg/kg ve 0,1 µg/kg dozları denenerak; Bu gruplardan otuz gün boyunca yaşayabilen ve kan hücre değerlerini değiştirmeyen en yüksek doz olan 0,25 µg/kg Depo tedavi dozu olarak ilk defa tespit edilmiştir,

Epo'nun plazma TNF-alfa seviyesi ve böbrek dokusu TNF-alfa mRNA, TNFR1 ve TNFR2 reseptörleri üzerine etkileri ilk defa sıçanda in-vivo deneysel koşullarda gösterilmiştir,

Sunulan çalışmada ölçülmek istenildiği halde numune, doku ya da kit kayıpları nedeniyle GFR, FENa+ ölçümleri ve Kaspaz aktivitesi yapılamamıştır. Bu ölçümler L-NAME ile oluşturulan kronik hipertansiyonda böbrek dokusu harabiyetinin fonksiyonel boyutları ve apoptotik yolağın daha iyi anlaşılması için önemli olacaktır.

Yapılacak çeşitli seviyedeki yeni çalışma ve deneysel modellerle; başta böbrek olmak üzere Epo reseptörü bulunan çeşitli dokularda hipertansiyona bağlı ortaya çıkan doku hasarları ve fonksiyonel bozukluklarda kan-doku epo seviyelerindeki değişiklikler, epo reseptör duyarlılıklarındaki farklılıklar ve dışarıdan epo tedavisinin doku koruyucu ve fonksiyon düzeltici etkilerinin mekanizmalarının ortaya çıkarılması hala

dünyada ölüm ve sakatlıkların birinci nedeni olmaya devam eden hipertansiyonun anlaşılması ve tedavisinde yeni ufuklar açabilecektir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aizawa, Y., Nogawa, N., Kosaka, N., Maeda, Y., Watanabe, T., Miyazaki, H., & Kato, T. (2005). Expression of Erythropoietin Receptor–Like Molecule in *Xenopus laevis* and Erythrocytopenia upon Administration of Its Recombinant Soluble Form. *Journal of Biochemistry*, *138*(2), 167-175. doi: 10.1093/jb/mvi113
- Aleman, C. L., Mas, R.M., Rodeiro, I., Noa, M., Hernandez, C., Menendez, R., Gamez, R. (1998). Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Laboratory Animals*, *32*, 457-466.
- Ali-Hassan-Sayegh, S., Mirhosseini, S.J., Tahernejad, M., Mahdavi, P., Haddad, F., Shahidzadeh, A., Lotfaliani, M.R., Sedaghat-Hamedani, F., Kayvanpour, E., Weymann, A., Sabashnikov, A., Popov, A.F. (2015). Administration of erythropoietin in patients with myocardial infarction: does it make sense? An updated and comprehensive meta-analysis and systemic review. *Cardiovascular Revascularization Medicine*.
- Azarov, I., Huang, K.T., Basu, S., Gladwin, M.T., Hogg, N., Kim-Shapiro, D.B., . (2005). Nitric oxide scavenging by red blood cells as a function of hematocrit and oxygenation. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(47), 39024-39032 p.
- Badyal, D. K., Lata, H., Dadhich, A.P., . (2003). Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian Journal of Pharmacology*, *35*, 349-362.
- Bemelmans, M. H. A., van Tits, L.J.H., Buurman, W.A.,. (1996). Tumor necrosis factor, release and clearance. *Critical Reviews in Immunology*, *16*, 1-11 p.
- Bittroff, T., Büchse, T., Sasse, T., Jaster, R., Brock, J. (2011). Activation of the transcription factor NF- κ B by the erythropoietin receptor structural requirements and biological significance. *Cellular Signaling*, *13*, 673-681.
- Bondurant, M. C., Koury, M.J.,. (1986). Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Molecular and Cellular Biology* *6*(7), 2731-2733 p.
- Brines, M., Cerami, A. (2005). Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature*, *6*, 484-494.
- Brines, M., Cerami, A. (2013). Erythropoietin and engineered innate repair activators. *Methods Mol. Biol.*, *982*, 1-11.
- Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q., Smart, J., Su-Rick, C., Pobre, E., Diaz, D., Gomez, D., Hand, C., Coleman, T., Cerami, A. . (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(41), 14907-14912.
- Bruick, R. K., McKnight, S.L.,. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, *294*(5545), 1337-1340 p.
- Büyüköztürk, K. (1999). Türk Kardiyoloji Derneği Ulusal Hipertansiyon Tedavi ve Takip Kılavuzu. <http://tkd.org.tr>: Türk Kardiyoloji Derneği.
- Calapai, G., Marciano, M.C., Corica, F., Allegra, A., Parisi, A., Frisina, N., Caputi, A.P., Buemi, M. (2000). Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *European Journal of Pharmacology*, *401*, 349-356.
- Carretero, O. A., Oparil, S. (2000). Essential hypertension: part 1: definition and etiology. *Circulation*, *101*, 329-335 p.
- Coldewey, S. M., Khan, A.I., Kapoor, A., Collino, M., Rogazzo, M., Brines, M., Cerami, A., Hall, P., Sheaff, M., Kieswich, J.E., Yaqoob, M.M., Patel, N.S., Thiemermann, C. (2013). Erythropoietin attenuates acute kidney dysfunction in murine experimental sepsis by activation of the β -common receptor. *Kidney International*, *84*(3), 482-490.
- Dame, C., Fahnenstich, H., Freitag, P., Hofmann, D., Abdoul-Nour, T., Bartmann, P., Fandrey, J.,. (1998). Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood*, *92*, 3218-3225 p.

KAYNAYLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Daniel P. Stites, A. I. T. (1991). *Basic and Clinical Immunology* (seventh ed.): Lange Medical Book.
- Digicaylioglu, M., Lipton, S.A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. *Nature*, *412*, 641-647.
- Dörffel, Y., Latsch, C., Stuhlmüller, B., Schreiber, S., Scholze, S., Scholze, S., Burmester, G.R., Scholze, J. (1999). Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension*, *34*, 113-117.
- Ebert, B. L., Bunn, H.F.,. (1999). Regulation of erythropoietin gene. *Blood*, *94*, 1864-1877 p.
- Edmonds, M. (2010). What is apoptosis? , from science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/apoptosis.htm
- Erhe, G., Boucher, M., Chuprun, J.K., Zhou, R.H., Eckhart, A.D., Koch, W.J.,. (2007). Darbepoetin α , a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *293*, H60-68 p.
- Esunge, P. M. (1991). From blood pressure to hypertension: the history of research. *Journal of Royal Society of Medicine*, *84*, 621.
- Fatouros, M., Dalekos, G.N., Mylonakis, E., Vekinis, G., KAppas, A.M.,. (1999). Alterations in body weight, breaking strenght, and wound healing in Wistar rats treated pre- and postoperatively with erythropoietin or granulocyte macrophage-colony stimulating factor: evidence of a previously unknown anabolic effect of erythropoietin. *J Lab Clin Med*, *133*(253-259 p.).
- Filho, A. G., Kinote, A., Pereira, D.J., Renno, A., Santos, R.C., Melo, S.E.F., Velloso, L.A., Bordin, S., Anhe, G.F., Junior, H.M., . (2013). Infliximab prevents increased systolic blood pressure and upregulates the AKT/eNOS pathway in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, *700*, 201-209 p.
- Frenay, A. N. S., Ruifrok, W.P.T., Bulthuis, M., Huitema, S., Boer, R.A., Goor, H.,. (2012). Renal effects of long term darbepoetin alpha treatment in hypertensive TGR(mRen2)27 rats. *Journal Of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, *13*(2), 232-238 p.
- G.E., J. (2000). Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *Journal of Leukocyte Biology*, *68*, 593-602.
- Gholamzadeh, A., Amini, S., Mohammadpour, A.H., Vahabzadeh, M., Fazelifar, A.F., Fazlinezhad, A., Denghani, M., Moohebbati, M., Dastani, M., Malaekheh-Nikouie, B., Falsoleiman, H. (2015). Erythropoietin reduces post-PCI arrhythmias in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*.
- Gobe, G., Browning, J., Howard, T., Hogg, N., Winterford, C., Cross, R. (1997). Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertenison-induced microvascular rarefaction. *Journal of Structural Biology*, *118*, 63-72.
- Guyton, A. C., Hall , J.E.,. (2007). *Tıbbi Fizyoloji* (Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.Ç., ed. Vol. 11): Nobel Tıp Kitapevleri.
- Hacioglu, G., Agar, A., Ozkaya G.,. (2002). The effect of different hypertension models on visual evoked potentials. *Int J Neuroscience*, *112*, 1321-1335.
- Han, C., Zhao, Q., Lu, B.,. (2013). The role of nitric oxide signaling in food intake; insights from the inner mitochondrial membrane peptidase 2 mutant mice. *Redox Biology*, *1*, 498-507 p.
- Hierro, L. C., Lazo, P.S.,. (2012). Signal transduction by tumornecrosis factor receptors. *Cellular Signaling*, *24*, 1297-1305 p.
- High Blood Pressure - 2013 Statistical Fact Sheet. (2013). *American Heart Association/American Stroke Association*.
- Hsd: Sprague Dawley. (2008). from Harlan Laboratories
<http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hbp/>.
- Hung, R. W. Y., Chow, A.W. (1997). Apoptosis: Molecular mechanisms, regulation and role in pathogenesis. *Can J Infect Dis*, *8*(2), 103-109.
- Iturbe, B. R., Ferrebuz, A., Vanegas, V., Quiroz, Y., Mezzano, S., Vaziri, N.D. (2005). Early and sustained inhibition of nuclear factor-b prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *JPET*, *315*, 51-57.

KAYNAYLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Jazi, F. E., Nematbakhsh, M., Pezeshki, Z., Nasri, H., Talebi, A., Safari, T., Mansouri, A., Mazaheri, S., Ashrafi, F., . (2013). Sex differences in protective effect of recombinant human erythropoietin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *International Journal of Kidney Diseases*, 7, 383-389 p.
- Jelkmann, W. (2007). Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *European Journal of Haematology*, 78, 183-205 p.
- Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*, 589(6), 1251-1258 p.
- Jelkmann, W. (2014). The ESA scenairo gets complex: from biosimilar epoetins to activin traps. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 0, 1-7.
- Jelkmann, W., Elliot, S. (2013). Erythropoietin and the vascular wall: the controversy continues. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Suppl1*, 37-43 p.
- Jelkmann, W., Elliot, S.,. (2013). Effects of erythropoietin on blood vessels and the heart *Frontiers in Drug Discovery Erythropoetic Stimulating Agents* (pp. 180-204): Bentham Science Publishers.
- Jelkmann, W., Hellwig-Buergel, T. (1999). Tumor necrosis factor p55 receptor (TNF-RI) mediates the in vitro inhibition of hepatic erythropoietin production. *Experimental Hematology*, 27(2), 224-228.
- Ji, W., Li, Y., Wan, T., Wang, J., Zhang, H., Chen, H., Min, W. (2012). Both internalization and AIP1 association are required for TNFR2-mediated JNK Signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(9), 2271–2279.
- Johns, C., Gavras, I., Handy, D.E., Salomao, A., Gavras, H., . (1996). Models of experimental hypertension in mice. *Hypertension*, 28, 1064-1069.
- Johnson, C. S., Cook, C.A., Furmanski, P. (1990). In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha): reversal with exogenous erythropoietin (EPO). *Experimental Hematology*, 18(2), 109-113.
- Jun, J. H., Jun, N.H., Shim, J.K., Shin, E.J., Kwak, Y.L. (2014). Erythropoietin protects myocardium against ischemia-reperfusion injury under moderate hyperglycemia. *European Journal of Pharmacology*, 745, 1-9.
- Katakura, F., Katzenback, B. A., & Belosevic, M. (2014). Molecular and functional characterization of erythropoietin receptor of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 45(2), 191-198. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.017>
- Kaur, M., Rana, A.C., Kumar, S.,. (2011). Induction of hypertension by various animal models. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(2), 335-340.
- Kelly, M. L., Wang, M., Crisostomo, P.R., Abarbanell, A.M., Herrmann, J.L., Weil, B.R., Meldrum, D.R. (2010). TNF receptor 2, not TNF receptor 1 enhances mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection following acute ischemia. *Shock*, 33(6), 602–607.
- Kertesz, N., Wu, J., Chen, T.H.P., Sucav, H.M., Wu H.,. (2004). The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Developmental Biology*, 276, 101-110 p.
- Kishore, R., Tkebuchava, T., Sasi, S.P., Silver, M., Gilbert, H., Yoon, Y., Park, H., Thorne, T., Losordo, D.W., Goukassian, D.A. (2011). Tumor necrosis factor- α signaling via TNFR1/p55 is deleterious whereas TNFR2/p75 signaling is protective in adult infarct myocardium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 691, 433-448.
- Kleinert, H., Forstermann, U. (2007). Nitric oxide Synthase(s). *The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1-7.
- Kouhata, S. I., Kagaya, A., Nakae, S., Nakata, Y., Yamawaki, S., . (2001). Effect of acute lippolysaccharide administration on(+)- 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2 aminopropane-induced wet dog shake behaviour in rats: comparison with body weight change and locomotor activity. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat*, 25, 295-407 p.
- Koury, M. C., Bondurant, M.C. (1990). Erthropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*, 248, 378-381.

KAYNAYLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Krügel, Ü., Fischer, J., Radicke, S., Sack, U., Himmerich, H., (2013). Antidepressant effects of TNF- α blockade in an animal model of depression. *Journal Of Psychiatric Research*, 47, 611-616 p.
- La Ferla, K., Reimann, C., Jelkmann, W., Hellwig-Bürgel, T. (2002). Inhibition of erythropoietin ene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kB. *FASEB Journal*, 16(13), 1811-1813.
- Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., Savino, C., Bianchi, M., Nielsen, J., Gerwien, J., Kallunki, P., Larsen, A.N., Helboe, L., Christensen, S., Pedersen, L.O., Nielsen, M., Torup, L., Sager, T., Sfactoria, A., Erbayraktar, S., Erbayraktar, Z., Gokmen, N., Yilmaz, O., Cerami-Hand, C., Xie, Q., Coleman, T., Cerami, A., Brines, M. . (2004). Derivates of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 305(239-242).
- Lipsic, E., Schoemaker, R.G., van der Meer, P., Voors, A.A., van Veldhuisen, D.J., van Gilst W.H. . (2006). Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia. *Journal of American College of Cardiology*, 48(11), 2161-2167.
- MacDougall, I. A., Padhi. D., Jang, G. (2007). Pharmacology of darbepoetin α . *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(Suppl4), iv2-iv9.
- Mancini, D. M., Katz, S. D., Lang, C. C., LaManca, J., Hudaihed, A., & Androne, A. S. (2003). Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure. *Circulation*, 107(2), 294-299.
- Medvedev, A. E., Espevik, T., Ranges, G., Sundan, A., . (1996). Distinct Roles of the Two Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in Modulating TNF and Lymphotoxin a Effects. *The Journal of Biological Chemistry*, 27(16), 9778-9784 p.
- Meziri, F., Binda D., Touati, S., Pellegrin, M., Berthelot, A., Touyz, R.M., Laurant, P., . (2011). Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin. *Eur J Appl Physiol*, 111, 1929-1938 p. .
- Moncada, S., Higgs, E.A. . (2006). the dizcovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, 147, 193-201.
- Montecucco, F., Pende, A., Quercioli, A., Mach, F. (2011). Inflation in the pathophysiology of essential hypertension. *Journal of Nephrology*, 24(01), 23-34.
- Moreau, C., Lariviere, R., Kingma, I., Grose, J.,H., Lebel, M.,. (2000). Chronic nitric oxide inhibition aggravates hypertension in erythropoietin-treated renal failure rats. *Clin. And Exper. Hypertension*, 22(7-8), 663-674 p.
- Morillas, P., Andrade, H., Castillo, J., Quiles, J., Bertomeu-Gonzalez, V., Cordero, A., Tarazon, E., Rosello, E., Potoles, M., Rivera, M., Bertomeu-Martinez, V. (2012). Inflation and apoptosis in hypertension. Relevance of extent of target organ damage. *Rev Esp Cardiol*, 1-7.
- Morley, j. E., Farr, S.A., Sell, R.L., Hileman, S.M., Banks, W.A.,. (2011). Nitric oxide is a central component in neuropeptide regulation of appetite. *Peptides*, 32, 776-780 p.
- Mullins, L. J., Bailey, M.A., Mullins, J.J.,. (2006). Hypertension, kidney and transgenics: a fresh perspective. *Pyysiol. Rev.*, 86, 709-746 p.
- Nairz, M., Schroll, A., Moschen, A.R., Sonnweber, T., Theurl, M., Theurl, I., Taub, N., Jamnig, C., Neurauter, D., Huber, L.A., Tilg, H., Moser, P.L., Weiss, G. (2011). Erythropoietin contransingly affects bacterial Infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kB-inducibile immune pathways *Immunity*, 34, 61-74.
- Nangaku, M. (2013). Tissue Protection by erythropoietin: new findings in a moving field. *Kidney International*, 84, 427-429.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*, 6, 3051-3064.
- Nathan, C., Xie, Q. (1994). Regulation of biosynthesis if nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 13725-13728.

KAYNAYLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Navarro-Gonzales, J. F., Mora, C., Muros, M., Ana, J., Herrera, H., Garcia, J. (2008). Association of tumor necrosis factor alpha with early target organ damage in newly diagnosed patients with essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 26, 2168-2175.
- Odelia, K., Stuibler, M., Golishevski, N., Lifshitz, L., Tremblay, M.L., Gassmann, M., Mittelman, M., Neumann, D., . (2010). Erythropoietin treatment leads to reduced blood glucose levels and body mass: insights from murine models. *Journal of Endocrinology*, 205, 87-95 p.
- Oparil, S., Zaman, M.A., Calhoun, D.A. (2003). Pathogenesis of hypertension. *Annals of Internal Medicine*, 139, 761-776 p.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaduet, L.,. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology Reviews*, 87(1), 315-424.
- Papaconstantinou, I., Zeglinas, C., Gazouli, M., Nastos, K., Yiallourou, A., Lykoudis, P., Evangelou, K., Papalois, A., Papaioannou, M., Vlachogiannakos, J., Tzathas, C. . (2014). Effect of infliximab on the healing of intestinal anastomosis. An experimental study in rats. *International Journal of Surgery*, 12, 969-975.
- Parsa, C. J., Kim, J., Riel, R. U., Pascal, L. S., Thompson, R. B., Petrofski, J. A., . . . Koch, W. J. (2004). Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*, 279(20), 20655-20662. doi: 10.1074/jbc.M314099200
- Paulis, L., Zicha, J., Kunes, J., Hojna, S., Behuliak, M., Celec, P., Kojsova, S., Pechanova, O., Simko, F.,. (2008). Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertension Research*, 31(4), 793-803.
- Pavel, H., Lucie, R., Than-Vinh, D., Emmanuel, T., Sergei, O., Louis, G., Francis, G., Johanne, T. (1995). Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*, 26(4), 642-648.
- Pia Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., Viviani, B., Marinovich, M., Cerami, A., Coleman, T.R., Brines, M., Ghezzi, P. (2003). Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(6), 971-975.
- Pinto, Y. M., Paul, M., Ganten, D.,. (1998). Lessons from rat models of hypertension: from goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research*, 39, 77-88 p.
- Probst, R. J., Lim, J.M., Bird, D.N., Pole, G.L., Sato, A.K., Claybaugh, J.R. (2006). Gender differences in the blood volume of conscious Sprague Dawley rats. *Journal of American Association of Laboratory Animal Sciences*, 45(2), 49-52.
- Puimege, L., Libert, C., Hauwermeiren, F.,. (2014). Regulation and Dysregulation of Tumor Necrosis Factor Receptor-1. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25, 285-300 p.
- Quiroz, Y., Bravo, J., Herrera-Acosta, J., Johnson, R.J., Iturbe, B.R. (2003). Apoptosis and NFB activation are simultaneously induced in renal tubulointerstitium in experimental hypertension. *Kidney International*, 64, 27-32.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., Cayota, A., . (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(5), 463-488.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. . (1986). *Immunology*: Gower Medical Publishing.
- Roxborough, H. E., Young, I.S. . (1995). Carbamylation of proteins and atherogenesis in renal failure. *Medical Hypotheses*, 45, 125-128.
- Ruschitzka, F. T., Wenger, R.H., Stallmach, T., Quaschnig, T., de Wit, C., Wagner, K., Labugger, R., Kelm, M., Noll, G., Rüllicke, T., Shaw, S., Lindberg, R.L.P., Rodenwaldt, B., Lutz, H., Bauer, C., Lüscher, T.F., Gassmann, M., . (2000). Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *PNAS*, 97(21), 11609-11613 p.
- Sharples, E. J., Patel, N., Brown, P., Stewart, K., Mota-Philipe, 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, 2115-2124.

KAYNAYLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Soszynski, D. (2002). Inhibition of nitric oxide synthase delays the development of tolerance to LPS in rats. *Physiology and Behavior*, 76, 159-169 p.
- Souza, A. C. C. P., Volpini, R.A., Shimizu, M.H., Sanches, T.R., Camara, N.O.S., Semedo, P., Rodrigues, C.E., Seguro, A.C., Andrade, L. (2012). Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NfKappaB and upregulating endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 302, 1045-1054.
- 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, 330-336.
- Sprague Dawley Rat.
- Stamatos, N., Curreli, S., Zella, D., Cross, A. (2003). Desialylation of glycoconjugates on the surface of monocytes activates the extracellular signal-related ERK 1/2 and results in enhanced production of specific cytokines. *Journal of Leukocyte Biology*, 75, 307-313.
- Suzuki, N., Ohneda, O., Takahashi, S., Higuchi, M., Mukai, H.Y., Nakahata, T., Imagawa, S., Yamamoto, M.. (2002). Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood*, 100, 2279-2288 p.
- Tada, H., Kagaya, Y., Takeda, M., Ohta, J., Asaumi, Y., Satoh, K., Ito, K., Karibe, A., Shirato, K., Minegishi, N., Shimokawa, H. (2006). Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiovascular Research*, 71, 466-477.
- Tanır, M., Şener, T., İnal, M., Akyüz, F., Uzuner, K., Sivri, E.. (2005). Effect of quercetin and glutathione on the level of superoxide dismutase, catalase, malonyldialdehyde, blood pressure and neonatal outcome in a rat model of pre-eclampsia induced by NG-nitro-L-arginine-methyl ester. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 118(190-195).
- Testa, U. (2004). Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Nature*, 18, 1176-1199.
- Thalayasingam, N., Isaacs, J.D. (2011). Anti-TNF therapy. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 25, 549-567.
- Tracey, K. J., Cerami, A.. (1993). Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Critical Care Medicine*, 21(10), 415-422 p.
- Tsuchiya, T., Okada, M., Ueda, M., Yasukochi, Y.. (1997). Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 Region. *J. Biochem*, 121(2), 193-196 p.
- Türk hipertansiyon insidans çalışması. (2008). *Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği*.
- Ueba, H., Brines, M., Yamin, M., Umemoto, T., Ako, J., Momomura, S., Cerami, A., Kawakami, M. (2010). Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14357-14362.
- Van Antwerp, D. J., Martin, S.J., Verma, I.M., Green, D.R. (1998). Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kB. *trends in Cell Biology*, 8, 107-111.
- van der Meer, P., Lipsic, E., Henning, R. H., Boddeus, K., van der Velden, J., Voors, A. A., . . . Schoemaker, R. G. (2005). Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 46(1), 125-133. doi: 10.1016/j.jacc.2005.03.044
- Vaziri, N., D., (1999). Mechanism of erythropoietin-induced hypertension. *Am J Kidney Dis*, 33(5), 821-828 p.
- Wang, C. N., Duan, G.L., Liu, Y.J., Yu, Q., Tang, X.L., Zhao, W., Li, X.H., Zhu, X.Y., Ni, X. (2015). Overproduction of nitric oxide by endothelial cells and macrophages contributes to mitochondrial oxidative stress in adrenocortical cells and adrenal insufficiency during endotoxemia. *Free Radical Biology and Medicine*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.024>

KAYNAYLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Wang, C. Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, A.S. (1998). NF-kB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281, 1680-1683.
- Wang, j., Toba, H., Morita, Y., Nakashima, K., Noda, K., Tian, W., Kobara, M., Nakata, T. (2013). Endothelial dysfunction, macrophage infiltration and NADPH oxidase-dependent superoxide production were attenuated by erythropoietin in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. *Pharmacology*, 91, 48-58.
- Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., Chopp, M. (2004). Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 35, 1732-1737.
- Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., Chopp, M.,. (2004). Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 35, 1732-1737 p.
- Wang, X. Q., Vaziri, N.D. (1999). Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension*, 33, 894-899.
- Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V.A., Frei, U., Wiesener, M., Eckardt, K.U., (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor(HIF)-1 and HIF-2 by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 target gene in Hep3B and KElly cells. *The FASEB Journal*, 18(12), 1462-1464 p.
- Wenger, R. H., Hoogewijs, D. (2010). Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 298, 1287-1296.
- Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K.T., . (2014). *İnsan Fizyolojisi- Vücut Fonksiyon Mekanizmaları* (T. Özgünen, Trans. Vol. 13): Güneş Tıp Kitabevleri.
- Wolf-Maier, K., Cooper, R.S., Kramer, H., Banegas, J.R., Giampaoli, S., Jofres, M.R., Poulter, N., Primatesta, P., Stegmayr, B., Thamm, M. (2004). Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and United States. *Hypertension*, 43, 10-17.
- Wu, H., Lee, S.H., Gao, J., Liu, X., Iruela-Arispe, M.L.,. (1999). Inactivation of erythropoietin leads to defect in cardiac morphogenesis. *Development*, 126, 3597-3605 p.
- Wu, K. S., Schmid-Schonbein, G.W. (2011). Nuclear Factor Kappa B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 57, 261-268.

8- ÖZGEÇMİŞ

Araştırma Görevlisi METE ÖZKURT

TC Kimlik No / Pasaport No:	10039459236
Doğum Yılı:	1978
Yazışma Adresi :	ESOGÜ Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD. 26480 Eskişehir/Türkiye
Telefon :	222-2392979/4577
e-posta :	mete.ozkurt@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	İstanbul Üniversitesi	VETERİNER FAKÜLTESİ	VETERİNER HEKİMLİĞİ TEMEL BİLİMLER	Lisans	2006

AKADEMİK DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Türkiye	Eskişehir	TEMEL TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi	2009-

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	2
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	19

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

1. Bilgin, Burak; Gursoy, Huseyin; Basmak, Hikmet; Ozkurt, Mete; Tuncel, Nese; Canaz, Funda; Isiksoy, Serap; Colak, Ertugrul, The effects of bupivacaine injection and oral nitric oxide on extraocular muscle in the rabbit, 2013, GRAEFES ARCHIVE FOR CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY

2. Kaygisiz, Ziya; Kaygisiz, Bilgin; Ozkurt, Mete; Kilinc, Erkan, The effects and mechanisms of action of diethylcarbamazine citrate in isolated rat hearts, 2013, ANADOLU KARDIOLOJİ DERGİSİ-THE ANATOLIAN JOURNAL OF CARDIOLOGY
3. Akyazi, Ibrahim; Eraslan, Evren; Gulcubuk, Ahmet; Ekiz, Elif Ergul; Cirakli, Zeynep L.; Haktanir, Damla; Bala, Deniz Aktaran; Ozkurt, Mete; Matur, Erdal; Ozcan, Mukaddes, Long-term aspirin pretreatment in the prevention of cerulein-induced acute pancreatitis in rats, 2013, WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY
4. Erkasap, N.; Ozkurt, M.; Erkasap, S.; Yasar, F.; Uzuner, K.; Ihtiyar, E.; Uslu, S.; Kara, M.; Bolluk, O., Leptin receptor (Ob-R) mRNA expression and serum leptin concentration in patients with colorectal and metastatic colorectal cancer, 2013, BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH
5. Yildirim, Abidin; Baseskioglu, Barbaros; Temel, Halide E.; Erkasap, Nilufer; Yenilmez, Aydin; Uslu, Sema; Ozer, Caner; Ozkurt, Mete; Donmez, Turgut, Effect of alpha lipoic acid and silymarin on bladder outlet obstruction, 2013, EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE
6. Kucuk, A.; Yucel, M.; Erkasap, N.; Tosun, M.; Koken, T.; Ozkurt, M.; Erkasap, S. The effects of PDE5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats, 2012, MOLECULAR BIOLOGY REPORTS
7. Yelken, Birgul; Erkasap, Nilufer; Bayram, Banu; Us, Tercan; Ceylan, Ilkay; Ozkurt, Mete; Aslan, Ferhat Gurkan, Genotyping of acinetobacter baumannii isolates from patients with severe sepsis in anesthesia intensive care unit, 2012, BRITISH JOURNAL OF ANAESTHESIA
8. Bayram, Banu; Sayin, Emrah; Erkasap, Nilufer; Onlu, Harun; Ozkurt, Mete; Sahin, Fezan; Turkoglu, Zuleyha, Lack of association between plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene 4G/5G polymorphism and osteoarthritis, 2012, RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL
9. Bayram, Banu; Kilicci, Cetin; Onlu, Harun; Ozkurt, Mete; Erkasap, Nilufer; Yildirim, Engin; Sahin, Fezan, Association of angiotensin converting enzyme (ACE) gene I/D polymorphism and polycystic ovary syndrome (PCOS), 2011, GENE
10. Kilicci, Cetin; Bayram, Banu; Ozkurt, Mete; Onlu, Harun; Erkasap, Nilufer; Mutlu, Fezan, Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Gene 4G/5G Polymorphism and Polycystic Ovary Syndrome, 2011, GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS
11. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Gene 4G/5G Polymorphism and Polycystic Ovary Syndrome. Kilicci C, Bayram B, Ozkurt M, Onlu H, Erkasap N, Mutlu F. Genet Test Mol Biomarkers; 2011 Mar 17.
12. Lack of association between plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene 4G/5G polymorphism and osteoarthritis. Banu Bayram, Emrah Sayin, Nilüfer

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. Effects of darbepoetin-alpha treatment and TNF-alpha blockage on cardiovascular parameters, blood cells, and body kidney weights in L-NAME induced hypertensive rats, Joint Meeting of FEPS and the Hungarian Physiological Society, 2014
2. Three polymorphisms and susceptibility to breast cancer development: a Turkish study population, Experimental Biology, 2014
3. The effects of alpha lipoic acid on apoptosss Nf-kB and INOS mRNA expression in experimental colitis, Experimental Biology 2014, 2014
4. The effects of bupivacaine injections and nitric oxide in rabbit extraocular muscles, ARVO Annual Meeting, 2012
5. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) Gene 4G/5G Polymorphism and Genetic Tendency to Colon Cancer, 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2012
6. The Relationship Between Colon Cancer and Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T Polimorfism., 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2012
7. Investigation of P53 Gene Codon72 Polymorphism in Colon Cancer, 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2012
8. Genotyping of Acineto Bacter Baumanni Isoolates From Patients With Severe Sepsis in Anesthesia Intensive Care Unit, 15th WFSA World Congress of Anaesthesiologists, 2012
9. The Effects of PDE5 Inhibitroy Drugs on Renal Ischemia reperfusion injury in rats, Turkish FEPS Fیزیoloji Congress, 2011
10. The Effects of Diethylcarbamazine Citrate on Isolated Rat Hearts, The Scandinavian Physiological Society's Annual Meeting, 2011
11. Comparison Of Leptin Receptor (Ob-R) mRNA Expression And Blood Leptin Levels in Human Colorectal And Metastatic Colorectal Cancer, Excellence in Oncology, 2010