

T.C
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç.Dr.Serhan Tuğlular

DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE RAPAMİSİN İLE BİRLİKTE
ERİTROPOETİN-ALFA VE STATİN UYGULAMASININ ENDOTEL
PROGENİTÖR HÜCRE SAYISI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Nefroloji Yan-Dal Uzmanlık Tezi
Uzm.Dr.Beyza Macunluođlu

İSTANBUL-2008

1. Giriş ve Amaç.....	1-2
2. Genel Bilgiler.....	3-28
2.1 Transplantasyon ve Kardiyovasküler Sistem (KVS)Hastalıkları.....	6
2.2 KVS hastalıklarının etyopatogenezi.....	6-7
2.2.1 Endotel hücre apoptozisi.....	7-8
2.2.2 Endotel Hücre Rejenerasyonu.....	9-11
2.3 Endotel Progenitor Hücreler (EPC).....	12
2.3.1 EPC Tanımı.....	12-13
2.3.2 EPC ve Neovaskülarizasyon.....	14-15
2.3.3 EPC Mobilizasyonu.....	16-17
2.3.4. EPC Doku Yerleşimi ve Diferansiyasyon Mekanizması.....	18-20
2.4 Kardiyovasküler risk faktörleri ve EPC.....	21
2.5 Hiperlipidemi ve EPC.....	21
2.6 Hipertansiyon ve EPC.....	21
2.7 Diyabet ve EPC.....	22
2.8 Transplantasyon ve EPC.....	22-23
2.9 EPC ve Rapamisin.....	23-24
2.10 EPC ve HMG-CoA Redüktaz İnhibitörleri.....	25-26
2.11 EPC ve Eritropoetin.....	27

3. Materyal-Metod.....	28-33
3.1. Deney hayvanları	
3.2: İlaçlar	
3.3.İlaçların hazırlanması ve uygulanması:	
3.4. Örneklerin toplanması:	
3.5. Değerlendirilecek Parametreler:	
3.6.Örneklerin değerlendirilmesi:	
3.7.İstatistiksel Değerlendirme:	
4.Sonuçlar:	34-38
5. Tartışma:	39-44
6. Özet:	45-46
7. Summary:	47-48
8. Literatürler:	49-65

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesinde 1999 Kasım – 2008 Temmuz arasında İç Hastalıkları asistanlık ve Nefroloji üst-ıhtisas eğitim dönemlerimde eğitimime katkısı olan başta Prof.Dr Emel Akođlu, Prof.Dr Çetin Özener, Doç.Dr Serhan Tuğlular, Doç.Dr Mehmet Koç, Uzm.Dr Hakkı Arıkan'a, değerli çalışma arkadaşlarım Uzm.Dr.Aydın Atakan, Uzm.Dr.Elif Arı , Uzm.Dr.Arzu Kahveci'ye ve yardımcı sağlık personeli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son dönem böbrek hastalığı tedavisinde günümüzde periton diyalizi, hemodiyaliz ve böbrek nakli olmak üzere üç farklı tedavi yöntemi bulunmaktadır. Ancak bu tedaviler arasında, hasta yaşam süresi ve yaşam kalitesini en olumlu yönde etkileyen tedavi böbrek naklidir. Son yıllarda immünsüpresif tedavide sağlanan ilerlemeler, greft yaşam süresini uzatmış ve klinisyenlerin dikkatini böbrek nakli hastalarının diğer sağlık problemlerine yönlendirmiştir. Bilindiği gibi, böbrek nakli hastalarında, çalışan renal allogreftle ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklar birinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle böbrek nakli hastalarında kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisi son derecede önemlidir (1).

Son yıllarda kardiyovasküler hastalık risk faktörlerinin endotel hücre hasarı ve endotel fonksiyon bozukluğuna neden olarak aterogenezi hızlandığı gösterilmiştir (2). Kemik iliğinden köken alan ve endotel progenitör hücresi olarak adlandırılan hücrelerin endotel tamirinden sorumlu olduğu ve bu hücrelerin sayısında ve fonksiyonlarında meydana gelen azalmanın kardiyovasküler hastalıkların progresyonunda önemli rolü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (2). Bu nedenle son yıllarda sistemik endotel progenitör hücre düzeylerinin potansiyel farmakolojik modülasyonu gündeme gelmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda özellikle HMG CoA redüktaz inhibitörleri (3,4), eritropoetin (5,6), granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) (7) ve östrojenin (8,9) endotel progenitör hücrelerini uyardığı gösterilmiştir.

Solid organ transplantasyonları sonrasında rejeksiyonun önlenmesi amacıyla güçlü immünsüpresif ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçların, bazı önemli yan etkileri bulunmakta ve bunlar arasında endotel hasarı da yer almaktadır. Literatürde kalsinörin inhibitörü olan takrolimus ve siklosporin A ile mTOR inhibitörü olan rapamisin ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (1). Bu çalışmalarda özellikle mTOR inhibisyonunun, endotel progenitör hücrelerinde apoptozis ve hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Ancak kalsinörin inhibitörleri ile ilgili aynı etki gözlenmemiştir(1).

Çalışmamızın amacı, mTOR inhibisyonu (rapamisin) ile immunsupresyon yapılan deneysel hayvan modelinde rapamisinle beraber statin ve eritropoetin alfa kullanımının EPC sayısı üzerine olan etkisinin değerlendirilmesidir.

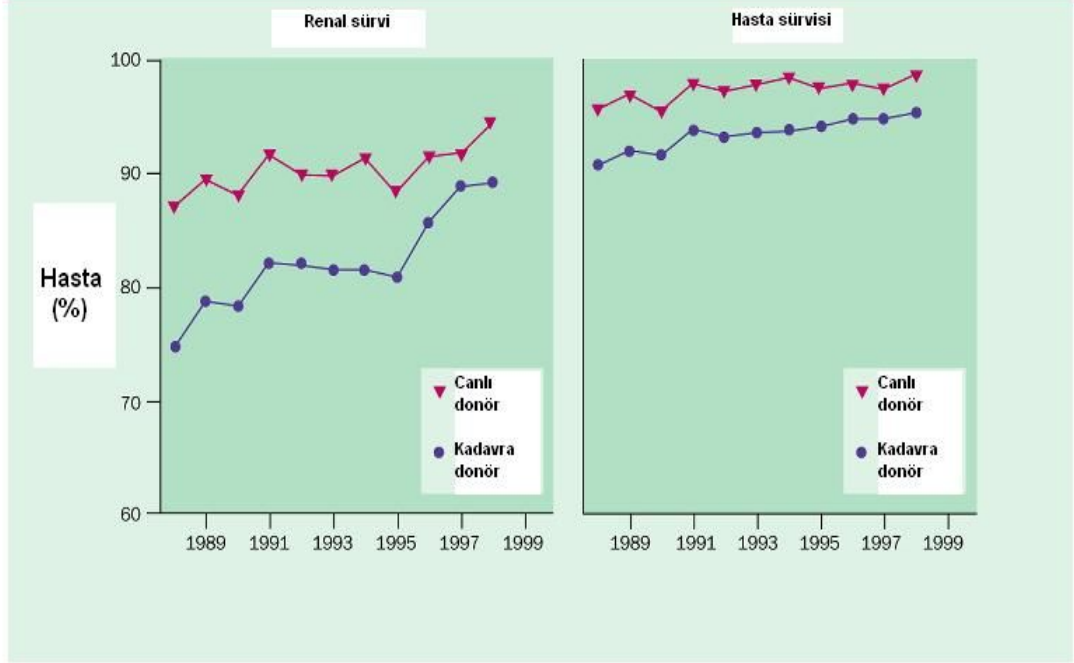
2. GENEL BİLGİLER

Böbrek nakli, tüm renal replasman tedavileri arasında, hasta yaşam süresi ve yaşam kalitesini en olumlu yönde etkileyen tedavi yöntemidir. Tüm dünyada günümüze kadar yaklaşık 500000 böbrek nakli gerçekleştirilmiştir ve bu sayının 200000 den fazlası A.B.D 'e aittir (10) Solid organ nakillerinde son yıllarda özellikle immünsüpresif tedavide ki gelişmeler sayesinde greft ömründe belirgin artış sağlanmıştır. 2000 yılı UNOS (United Network for Organ Sharing) verilerine göre kadavradan yapılan böbrek nakillerinde 1 ve 5 yıllık greft ömrü sırasıyla %89,4 ve %64,7 iken, canlı vericiden yapılan nakillerde %94,5 ve %78,4 olarak saptanmıştır. Hasta yaşam süresine bakıldığında ise, kadavradan yapılan nakillerde 1 ve 5 yıllık sonuçlar sırasıyla %95 ve % 82 iken canlı vericiden yapılan nakillerde %98 ve %91 olarak saptanmıştır (şekil 1)(11). UNOS verilerinden elde edilen ileri analizlerde ise canlı vericilerden yapılan böbrek nakillerinde greft yarı ömrünün 1988 ve 1996 yılları arasında 12,7 yıldan 21,6 yıla, kadavra nakillerinde ise 7,9 yıldan 13,8 yıla çıktığı gösterilmiştir.

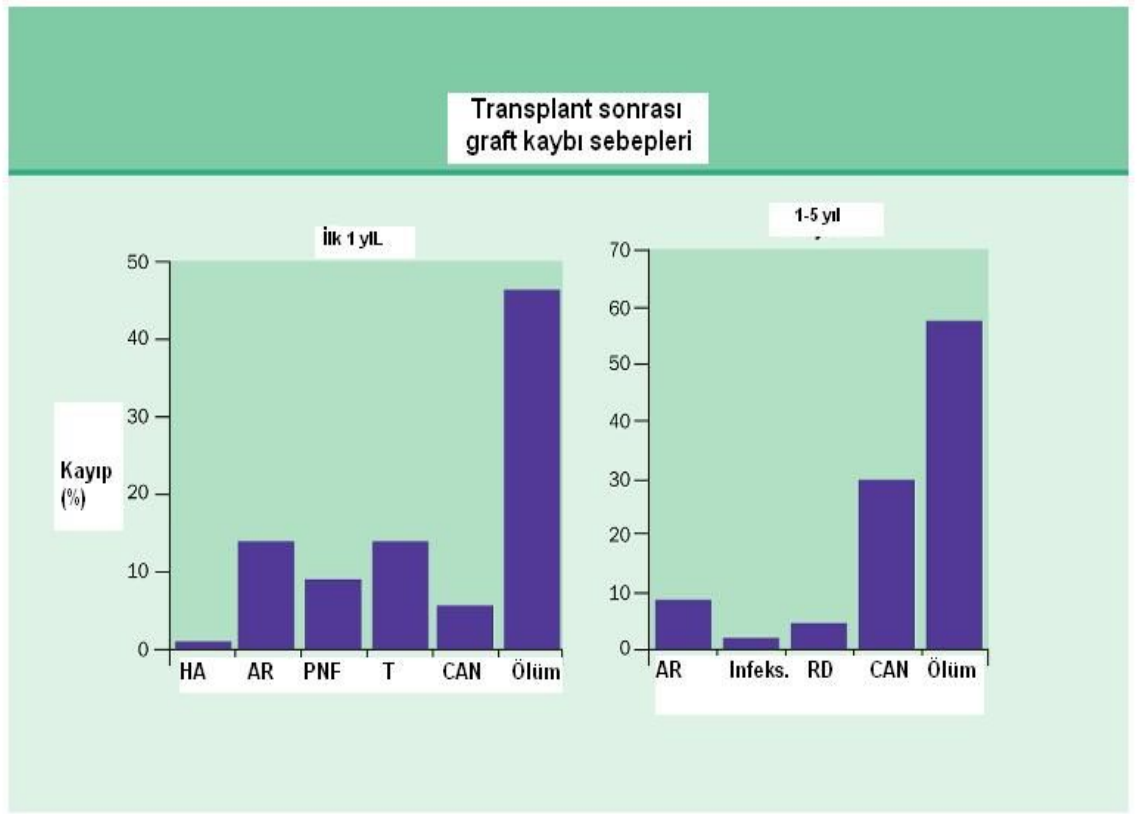
Greft kaybı, geç ve erken dönem kayıplar olarak iki dönemde değerlendirilir. İlk 12 aydaki kayıplar erken dönem greft kaybı olarak adlandırılır ve genellikle greft trombozu gibi teknik komplikasyonlar, hiperakut ve akut rejeksiyon, primer fonksiyon görmeyen böbrek veya çalışan greftle hasta ölümü önde gelen nedenler arasında yer almaktadır. Posttransplant erken dönemde görülen hasta ölümü nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklar ve enfeksiyon yer almaktadır(Şekil 2).

İlk 12 aydan sonra görülen kayıplar ise geç dönem greft kaybı olarak adlandırılır ve kronik allograft nefropatisi, çalışan greftle hasta ölümü esas sebepleri oluşturur. Geç dönem akut rejeksiyon ve tekrarlayan primer hastalık bu dönemdeki greft kayıplarının daha nadir görülen nedenleri arasındadır. (Şekil 2). Posttransplant geç dönemde ki hasta ölümü nedenlerinde ise birinci sırayı kardiyovasküler hastalıklar alırken, enfeksiyon ve maligniteye bağlı ölümler ikinci sırada yer almaktadır (12).

Transplant sonrası hasta ve renal sürvi oranları



Şekil 1: Transplantasyon sonrası hasta survisi ve renal survi oranları



© 2003, Elsevier Limited. All rights reserved.

Şekil 2: Transplantasyon sonrası erken ve geç dönem graft kaybı sebepleri

HA: Hiperakut rejeksiyon, AR: Akut rejeksiyon, PNF: Primer nonfonksiyone,
T: Tromboz, CAN: Kronik allograft nefropati, RD: Rekürren hastalık

2.1 Transplantasyon ve Kardiyovasküler Sistem (KVS)Hastalıkları:

Renal allograft alıcılarında mortalitenin en önemli sebepleri arasında kardiyovasküler hastalıklar yer almaktadır. Transplantasyon sonrasında ki 10 yıl içinde, çalışan greftle ölen hasta grubunda kardiyovasküler hastalığa bağlı ölüm oranı %36 olarak saptanırken, posttransplant 15 yıllık izlemde %23 hastada koroner arter hastalığı , %15 hastada serebrovasküler hastalık, %15 hastada ise periferik arter hastalığı gelişimi gözlenmektedir (12)

Transplantasyon sonrasında KVS hastalık risk faktörleri arasında, hipertansiyon, hiperlipidemi, hiperglisemi, ileri yaş, sigara, proteinüri ve renal yetersizlik gibi normal popülasyonda önde gelen sebepler yer almaktadır.

2.2 KVS hastalıklarının etyopatogenezi

Aterosklerotik damar hastalıkları, tüm dünyada en önde gelen ölüm sebepleri arasında yer almaktadır. Aterosklerozun klinik bulguları arasında myokard infarktüsü, kalp yetersizliği, inme ve periferik arter hastalığı yer almaktadır ve genellikle geri dönüşümsüz organ hasarı ile sonuçlanmaktadır. Yakın zamanda yayımlanan rehberlerde, aterosklerotik hastalıkların önlenmesinde yaşam tarzı değişikliği, risk faktörlerinin azaltılması ve serbest oksijen radikalleri ile endotel hücre hasarı gibi etkilerin azaltılmasının önemi vurgulanmıştır. Risk faktörleri ve ateroskleroz arasında ki ilişki iyi bilinmesine rağmen yaşam tarzı değişikliği ve risk faktörü azaltılmasına yönelik tedavilerde hasta uyumu oldukça düşük bulunmuştur. Bu nedenle özellikle kardiyovasküler hastalık sıklığını azaltmaya yönelik yeni tedavi seçenekleri araştırılmaktadır.

Günümüzde yapılan tüm çalışmalara rağmen aterosklerozun moleküler mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Hasara karşı cevap hipotezine göre, kardiyovasküler risk faktörleri endotel üzerine kimyasal veya mekanik hasar yaparak makrofaj invazyonu ve lipid birikimine neden olmaktadır(13). Endotel üzerine sürekli olarak devam eden hasar, endotel disfonksiyonuna neden olur (14). Moleküler ve hücresele düzeyde endotel disfonksiyonu, azalmış NO seviyesi ve endotel hücrelerinde ilerleyici kayıp ile karakterizedir (15,16).İnsanlarda, kardiyovasküler risk faktörleri varlığında görülen artmış endotel hücre hasarı, endotel hücre apoptozisine ve endotel bütünlüğünün bozulmasına yol açar.

2.2.1 Endotel hücre apoptozisi

Endotel hücre hasarı aterogeneze başlangıç basamağıdır. Endotel hücre apoptozisi plazma membranında değişiklikler, hücre çekirdeğinin büzüşmesi, DNA parçalanması ve küçük membran partiküllerinin salınımı ile ilişkilidir. Bu küçük membran partiküllerine endotelyal mikropartiküller adı verilir (17).Endotelyal mikropartikül düzeyleri in vivo olarak flow-sitometri ile tespit edilir ve ciddi endotel hücre hasarının görüldüğü trombotik trombositopenik purpura, diyabet, hipertansiyon, akut koroner sendrom ve myokard infarktüsü durumlarında artış gösterir. (18–21). Koroner arter hastalığı olanlarda dolaşan endotelyal mikropartikül düzeyleri, endotel disfonksiyonunun derecesi ile korelasyon göstermektedir (22) (figür 1).

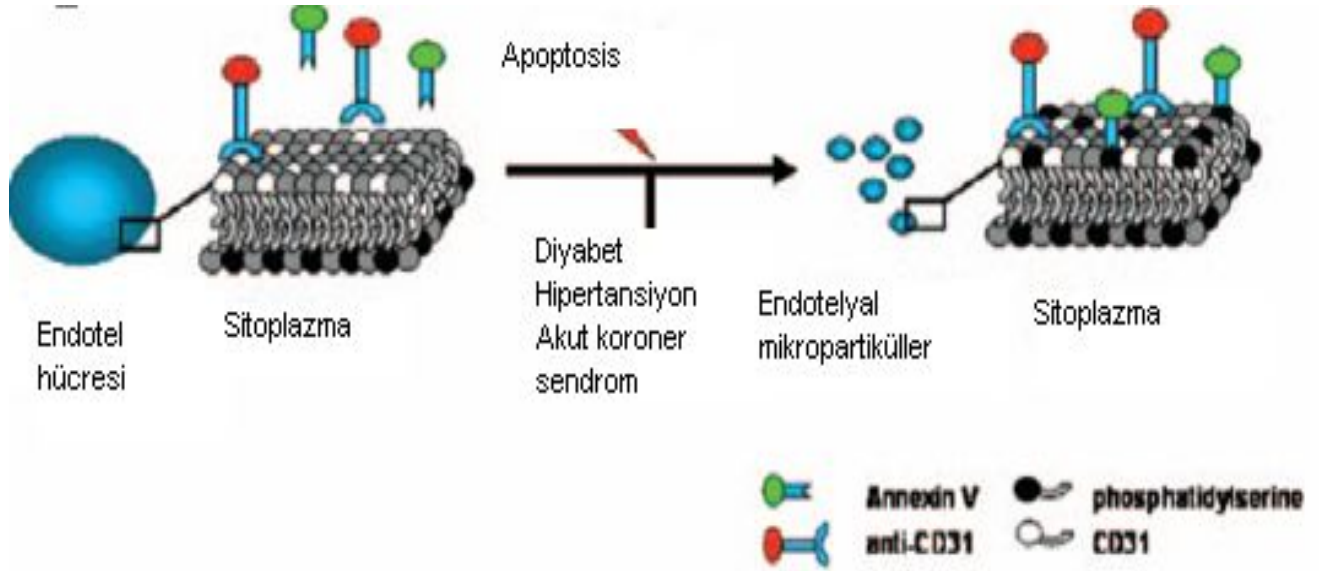


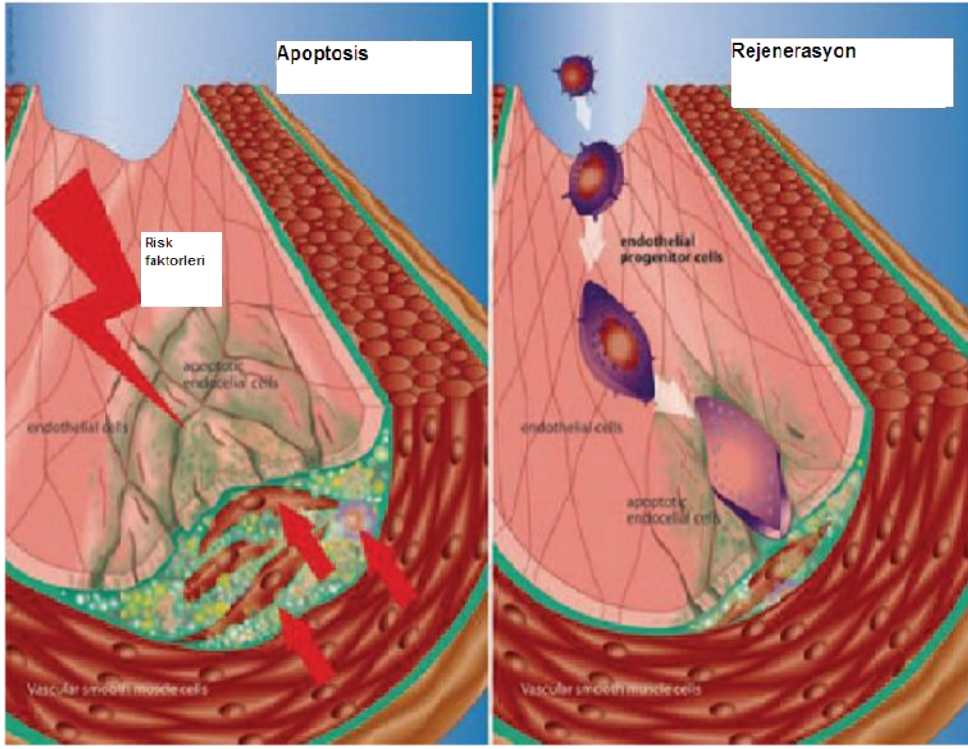
Figure 1: Endotel hücre apoptozisi endotelial mikropartiküller olarak adlandırılan küçük membran partiküllerinin salınımı ile ilişkilidir. Hücre apoptozisi sırasında, normalde sitoplazmik membranın iç tarafında yerleşim gösteren negatif yüklü fosfatidilserin ,membranın dış bölgesine lokalize olur. Floresan işaretli Annexin v , negatif yüklü fosfatidilserine bağlı olarak dolaşır. Dolaşan endotelial mikropartiküller flow sitometrik olarak değerlendirilebilir.

2.2.2 Endotel Hücre Rejenerasyonu

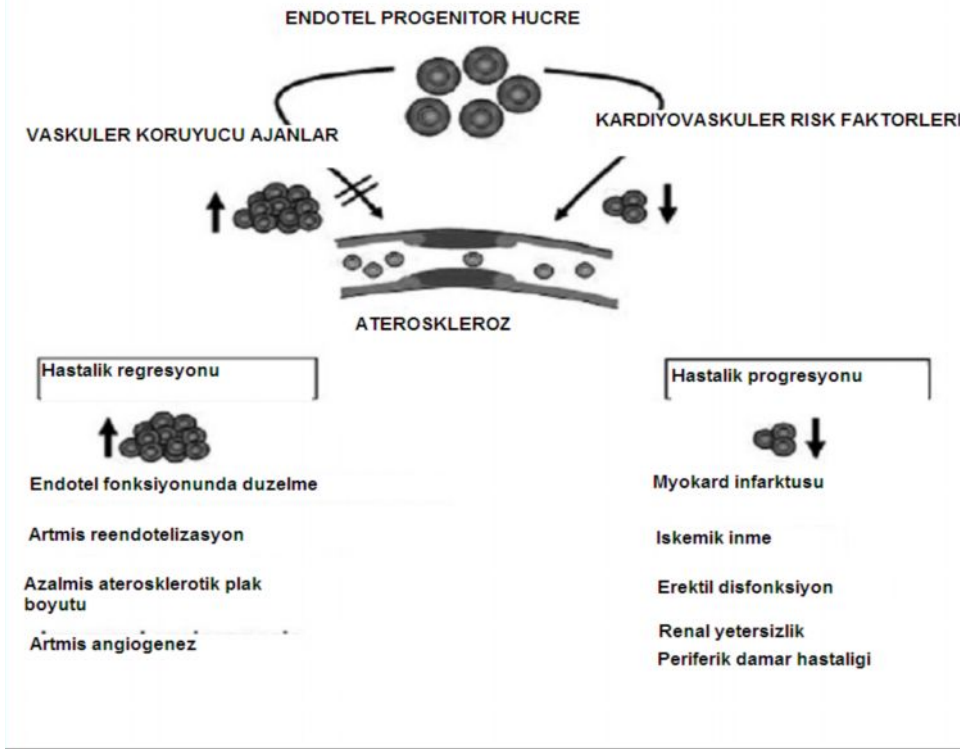
Fizyolojik koşullar altında endotel hücre apoptozisi, endotel hücre döngüsünü arttırarak hasarlı endotelin tamirine yol açar (Figür 2) . Daha önceleri endotel hücreleri tamir mekanizmalarının, komşu endotel hücreleri tarafından düzenlendiği düşünölmekteydi. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda matür endotel hücrelerinin rejenerasyon kapasitesinin düşük olduğu ve dolaşan endotel progenitör hücrelerinin (EPC) rejenerasyonda önemli rolü olduğu gösterilmiştir.

Endotel progenitör hücrelerinin sistemik transfüzyonu veya intrinsik mobilizasyonu, fokal endotel hasarı sonrasında endotel rejenerasyonuna neden olmaktadır (23,24). Yapılmış olan insan çalışmalarda yüksek EPC düzeyleri azalmış kardiyovasküler olay sıklığı ile ilişkili bulunmuştur ve bu sonuca dayanarak EPC lerin vasküler koruyucu etkileri olduğu sonucuna varılmıştır (25,26). Koroner arter hastalığı risk faktörleri, endotelyal hücre apoptozisine neden olarak sürekli devam eden endotel hasarına neden olurler. EPC lerin bu endotel hasarını tamir ettikleri düşünölmektedir (27) .

Diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara gibi risk faktörleri koroner arter hastalığı olanlarda veya sağlıklı popülasyonda EPC sayı ve fonksiyonlarında azalmaya neden olmaktadır (28,29). Bununla beraber kardiyovasküler risk azalmasına neden olan statin kullanımı ve egzersiz gibi faktörlerin EPC sayısında artışa neden olarak endotel tamirini arttırdıkları gösterilmiştir (3,30,31,32) (Figür 3).



Figür 2 Endotel hücre apoptosisi ve rejenerasyonu arasında ki denge aterosklerozun derecesini ve progresyonunu belirlemektedir.



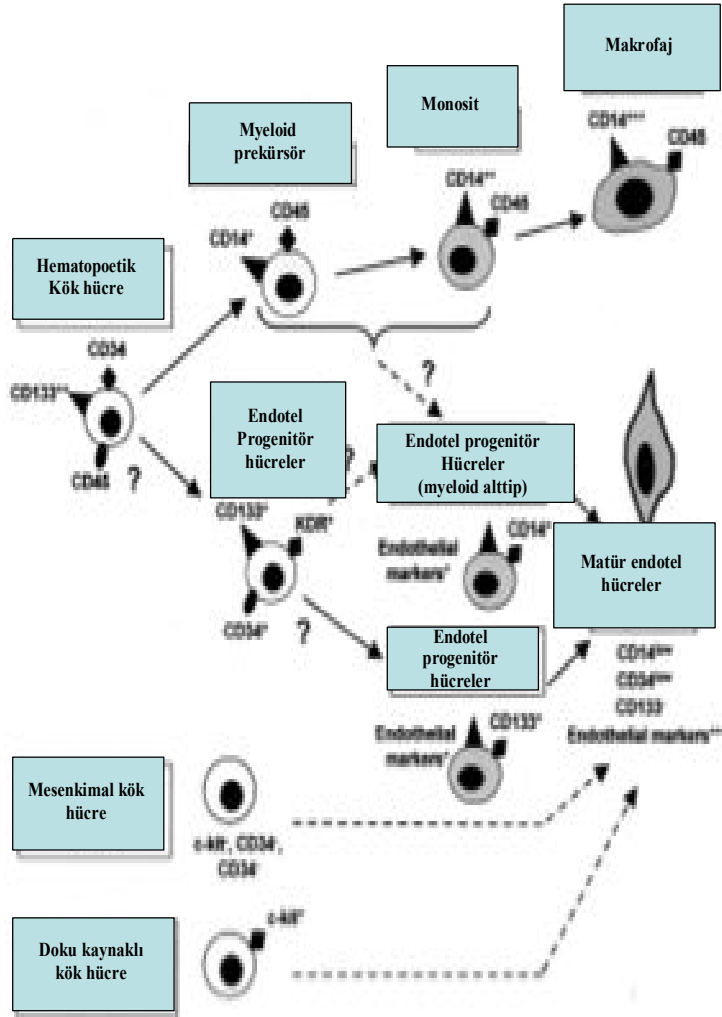
Figür 3 Vasküler koruyucu ajanlar EPC sayı ve fonksiyonunda artışa sebep olarak ateroskleroz progresyonunu önlerler. KVS risk faktörlerine bağlı olarak gelişen EPC sayı ve fonksiyonunda azalma aterosklerotik hastalık gelişimi ile ilişkilidir.

2.3 ENDOTEL PROGENİTOR HÜCRELER (EPC)

2.3.1 EPC TANIMI:

Mezodermal hücrelerin embriyonik gelişim sırasında angioblastlara ve endotel hücrelerine diferansiye olduğu düşünülmekteydi. Ancak bu düşünce 1997 yılında Asahara ve arkadaşlarının, erişkinlerden elde edilen purifiye CD 34 (+) hematopoetik progenitör hücrelerin ex vivo ortamda endotelial fenotipe diferansiye olduğunu göstermesiyle değişmiştir. Endotel progenitör hücresi olarak adlandırılan bu hücreler, endotel hücre işaretleri içerir ve iskemi alanında yeni damar oluşumunda rol alırlar (33). Endotel progenitör hücreleri, CD 34 gibi hematopoetik kök hücre işareti ile beraber VEGFR2 gibi endotel hücre işareti de içerirler. Ancak bunlar dışında son zamanlarda, endotelial hücre diferansiyasyonu gösterdiği düşünülen kemik iliği kökenli olan ve olmayan farklı hücre tipleri de tanımlanmıştır. Bunlar arasında myeloid hücreler, mezenkimal kök hücreler, doku kaynaklı kök hücreler ve damar duvarı kaynaklı endotel hücreler yer almaktadır(33).

CD 34 ekspresyonu sadece hematopoetik kök hücrelerde değil, daha az oranda olmakla beraber matür endotel hücrelerinde de görülür. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda CD 133 hematopoetik kök hücre yüzey işaretinin immatür hücrelere daha spesifik olduğu ve purifiye CD 133(+) hücrelerin in vitro ortamda endotel hücrelerine diferansiye olduğu gösterilmiştir (34). AC 133 veya Prominin olarak da adlandırılan CD133, biyolojik aktivitesi tam olarak bilinmeyen, matür hücrelerde ve monositlerde eksprese edilmezken hematopoetik kök hücrelerde eksprese edilen bir antijendir (35). Bu nedenle CD133+ VEGFR2+ hücreler genellikle immatur hücre grubunu yansıtırken CD34+ VEGFR2+ hücreler damar duvarında yerleşen daha matür hücre grubunu göstermektedir. Günümüzde halen CD133 ün sadece bir yüzey işaretimi yoksa neovaskularizasyon regülasyonunda fonksiyonel rolü olan bir antijen mi olduğu bilinmemektedir.

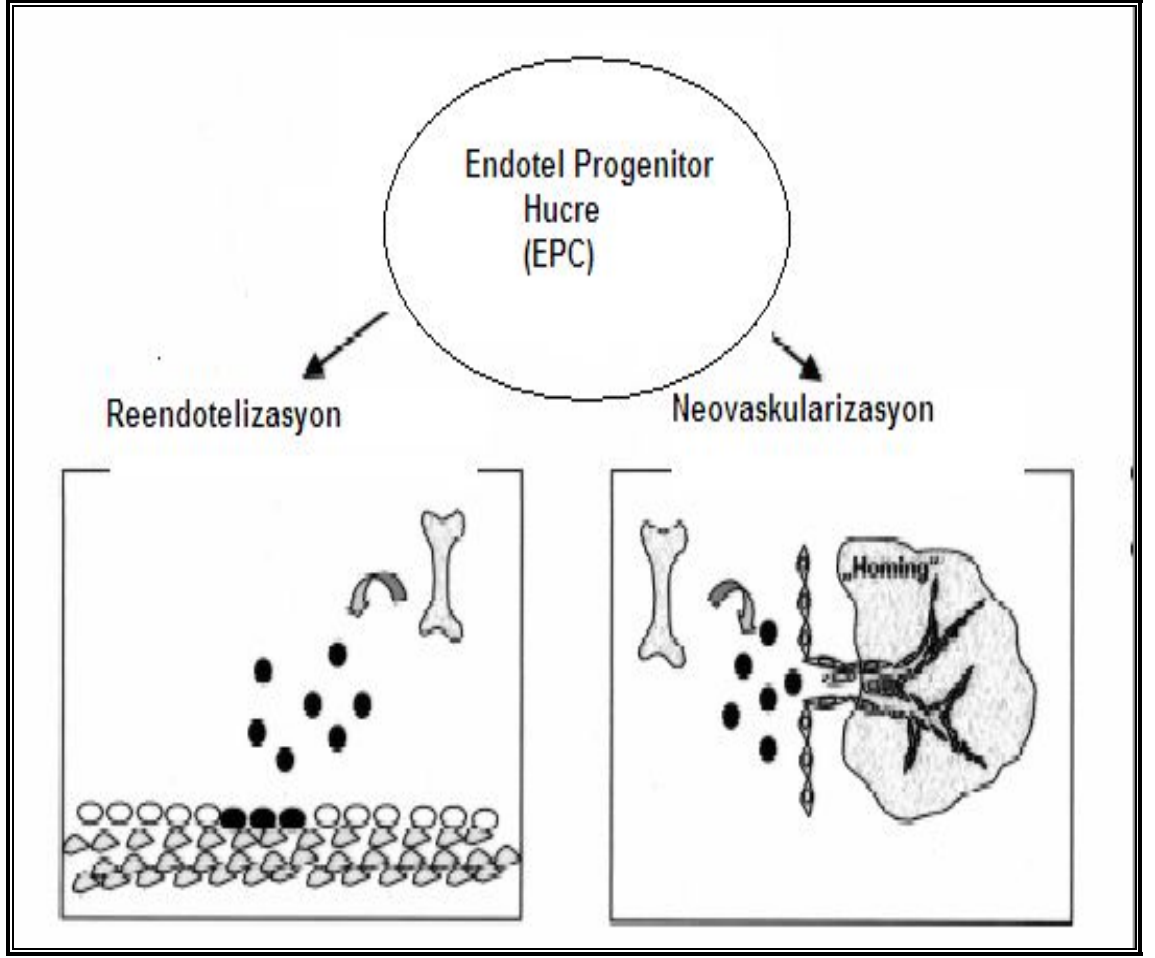


Figür 4: Endotel progenitor hücrelerin kaynağı ve diferansiasyonu. Şekilde hem hematopoetik kök hücre hem de nonhematopoetik hücrelerden EPC oluşumu şematik olarak gösterilmektedir.

2.3.2 EPC ve Neovaskularizasyon

Ciddi iskemi sonrasında, neovaskularizasyonda artış sağlanması ana tedavi hedefleri arasındadır (36). Kemik iliği kökenli hücrelerin, endotelial yüzey işareti eksprese ederek iskemi alanına doğru hareket ettiklerinin gösterilmesi sonrasında, izole hematopoetik kök hücre veya endotel progenitor hücrelerinin tedavi için kullanımları gündeme gelmiştir.

Kemik iliğinden veya hücre dışında kültür yöntemiyle izole edilen farklı hücre tiplerinin infüzyonu sonrasında iskemik dokuda yeni damar oluşumunun arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (37–39) (Figür 5). Myokard infarktüsü oluşturulan hayvan modellerinde, ex vivo olarak çoğaltılan endotel progenitor hücrelerinin enjeksiyonu sonrasında kan akımının arttığı, kardiyak fonksiyonun düzeldiği ve sol ventrikül fibrozisinin azaldığı gösterilmiştir (37,38). Sonrasında yapılan diğer pilot çalışmalarda da endotel progenitor hücrelerinin iskemik dokunun kanlanmasını arttırdıkları gösterilmiştir (40,41). Bu çalışmalarda, kullanılan EPC tipinden bağımsız olarak, EPC nin fonksiyonel kapasitesinin neovaskularizasyonda etkili olduğu gösterilmiştir (figür 5) .



Figür 5: Vasküler biyolojide EPC lerin rolü.

Endotel hasarı sonrasında EPC enjeksiyonu reendotelizasyon ve neovaskularizasyonu arttırmaktadır.

2.3.3 EPC Mobilizasyonu

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerinin mobilizasyonu, bölgesel mikroçevre tarafından düzenlenmektedir. Sitokin salınımında meydana gelen artış, kök hücreler ve stromal hücreler arasına olan ilişkiyi tetikleyerek transendotelial migrasyon vasıtasıyla kök hücrelerinin kemik iliğini terk etmesine yol açar. Elastaz, katepsin G, matrix metalloproteinaz (MMP), gibi proteinazların aktivasyonu sonucunda stromal hücreler hematopoetik kök hücrelerin yüzeyinde bulunan integrin molekülü ile etkileşime girer.

Fizyolojik olarak iskeminin, EPC'lerin kemik iliğinden mobilizasyonunda en önemli sinyal mekanizması olduğu düşünülmektedir. İskemi sonucunda VEGF veya SDF-1 (42,43) düzeylerinde artış meydana geldiği ve dolaşıma salındığı bunun sonucunda ise MMP-9 aktivasyonu ile progenitor hücrelerin kemik iliğinden mobilize olduğu düşünülmektedir (7,44-46).

Yakın zamanda endotel progenitor hücrelerinin kemik iliğinden mobilizasyonunda etkili olan ek faktörler tanımlanmıştır. Örnek olarak, bir sitokin olan granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) kullanımı dolaşan endotel progenitor hücre düzeyinde artışa neden olmaktadır. Benzer bir sitokin olan granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör de (GM-CSF) aynı şekilde EPC sayısını arttırmaktadır (7). Bunun dışında eritroid öncül hücrelerin çoğalma ve olgunlaşmasını uyaran eritropetin kullanımının hem deneysel hayvan modellerinde hem de insan çalışmalarında endotel progenitor hücre sayısında artışa neden olduğu gösterilmiştir (5,6).

EPC farmakolojik modülasyonu ile ilgili ilk çalışmalar, HMG CoA redüktaz inhibitörleri kullanılarak yapılmıştır. Statinlerin hem insan çalışmalarında hem de hayvan modellerinde EPC sayı ve fonksiyonunda artışa neden oldukları gösterilmiştir (3,4). Statinlerin, kemik iliğinde kök hücre sayısını arttırmak dışında, EPC çoğalmasında ve mobilizasyonunda artışa neden olduğu düşünülmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda östrojenin EPC sayısında artışa neden olduğu gösterilmiştir (8,9). Ayrıca egzersiz, hem insan çalışmalarında hem de hayvan modellerinde artmış EPC düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (47). Henüz moleküler sinyal yolu net olarak tanımlanmamıştır. Ancak yapılan bazı çalışmalarda, ilk defa statin kullanımıyla matür endotel hücrelerinde aktive olduğu gösterilen P13K/Akt yolunun, statine bağlı artmış EPC sayısında önemli rolü olduğu öne sürülmüştür (48,49,4). Benzer şekilde VEGF, EPO, östrojen ve egzersiz ile aynı yolun aktive olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle EPC sayısı üzerine etkili faktörler, bazı ortak sinyal yolları kullanmaktadır. Son çalışmalarda, NO sentetaz enziminin kemik iliğinden progenitör hücre mobilizasyonunda oldukça önemli olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, EPC mobilizasyonunu arttıran uyarıların, kemik iliği stromal hücrelerinde P13K/Akt bağımlı NO-sentetaz aktivasyonu yaparak etki gösterdiği öne sürülebilir. (figür 6)

2.3.4. EPC Doku Yerleşimi ve Diferansiyasyon Mekanizması

Son yıllarda özellikle neovaskularizasyon ile ilgili yoğun araştırmalara rağmen, EPC lerin doku yerleşimi ve diferansiyasyon mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ancak kemik iliğinden köken alan EPC lerin doku yerleşimi ve diferansiyasyonunda çok basamaklı bir süreç olduğu düşünülmektedir.

1-Adhezyon ve Transendotelyal Migrasyon

EPC lerin iskemik dokuya yerleşmesinde ilk basamaktır. Öncelikle, iskemi ve sitokinlere bağlı olarak aktive olan endotel üzerine progenitör hücre adhezyonu gerçekleşir ve sonrasında EPC ler endotel hücre katmanlarını geçerek transmigrasyona uğrar (50) . Integrin molekülleri, hematopoetik kök hücrelerin ve lökositlerin ekstraselüler matrix proteinlerine ve endotel hücrelerine adhezyonunda etkilidirler (51,52). Hücre- hücre etkileşiminde β 2- integrinler ve $\alpha\beta$ 1 integrin sorumludur. β 1 integrinler endotelyal hücreleri de içeren farklı hücre tiplerinde eksprese edilirken β 2- integrinler özellikle hematopoetik hücrelerde eksprese edilirler (53) . Integrinlerin, iskemik dokuya progenitör hücrenin yerleşmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Özellikle β 2- integrinler, hematopoetik kök hücrelerde ve progenitör hücrelerde yüksek ekspresyona sahiptirler ve bu hücrelerin adhezyon ve transmigrasyonunda etkilidirler (figür 6)

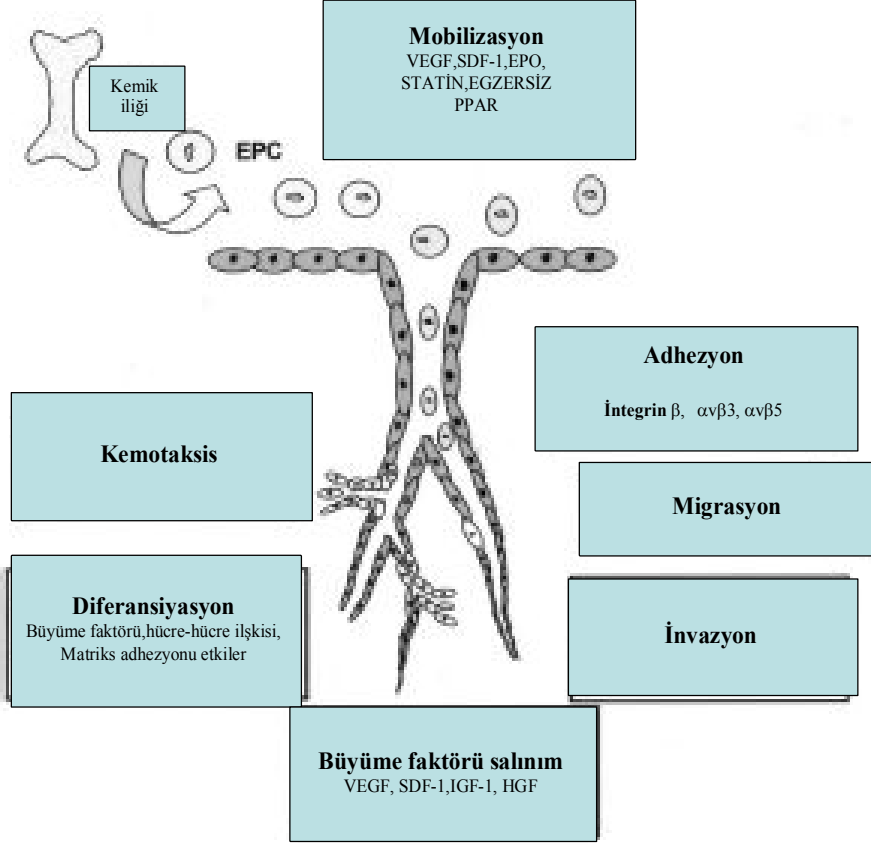
2-Kemotaksis, Migrasyon ve İnvazyon

Dolaşan EPC sayısının düşük olduğu düşünülürse, iskemik veya hasarlı dokuya yeterli sayıda EPC nin yerleşmesinde kemoatraksiyonun önemli rolü olduğu sonucu ortaya çıkacaktır. Çeşitli çalışmalarda hematopoetik kök hücrelerin kemik iliğine yerleşmesini sağlayan faktörler araştırılmıştır. Bunlar arasında SDF-1 (54,55) benzeri kemokinler, lipid medyatörleri (sfingozin 1 fosfat) (56) ve heterolog hücreler tarafından salınan faktörler yer almaktadır. Dolaşan EPC lerin iskemik dokuya yönelmesinde de bu faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir (57).

Bu faktörlerin dışında VEGF seviyesinin de iskemi sırasında arttığı ve EPC ler için kemoatraktif faktör olarak rol oynadığı öne sürülmüştür (42.46.58). Yakın zamanda yapılan çalışmalar EPC nin iskemik dokuya kemotaksisini regüle eden mekanizmalara ışık tutmuş olmakla beraber, migrasyon ve doku invazyonu ile ilgili bilgi çok daha azdır. Bununla beraber katepsin veya metalloproteaz gibi protezların EPC lerin doku invazyonunda rolü olabileceği düşünülmektedir, ancak bu konuyla ilgili net veri bulunmamaktadır (figür 6)

3-Diferansiasyon

Son olarak EPC lerin fonksiyonel endotel hücrelerine değişimi oldukça önemlidir. Bu farklılaşma olayında rol oynayan genetik döngü büyük oranda bilinmemektedir, ancak yapılan bazı çalışmalarda ana mezodermal öncül hücre olan hemangioblastların embriyonik gelişim sırasındaki diferansiyasyonları incelenmiştir. VEGF ve reseptörleri embriyonik gelişim sırasında, endotelial diferansiasyonda oldukça etkili rol oynamaktadır(59,60) (figür 6).



Figür 6. Endotel progenitör hücrelerin göçü ve dokuya yerleşimi: EPC lerin iskemik dokuya yerleşmesi; mobilizasyon, kemotaksis, adhezyon, migrasyon ve diferansiyasyon aşamalarından oluşur.

2.4 Kardiyovasküler risk faktörleri ve EPC

Yapılmış olan küçük klinik çalışmalarda ateroskleroz risk faktörlerinin, dolaşan endotel progenitör hücre sayısı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (25,26). Dolaşan CD34/KDR pozitif progenitör hücrelerin, koroner arter hastalığı olanlarda kontrol grubundakilere göre %50 oranında azaldığı saptanmıştır. Bununla beraber koroner arter hastalığı olanlardan elde edilen endotel progenitör hücrelerinin migrasyon cevabında azalma olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Arteriyel hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi, sigara, fiziksel inaktivite gibi kardiyovasküler risk faktörleri, azalmış EPC sayısı ve aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur. Bilinen risk faktörleri dışında, erken dönem koroner arter hastalığı aile hikâyesi, homosistein ve CRP düzeyleri gibi faktörler de EPC sayısı ve fonksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (61–63).

2.5 Hiperlipidemi ve EPC

Yakın zamanda yapılan çeşitli çalışmalarda, EPC düzeyleri ve hiperlipidemi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Serum kolesterol düzeyi yüksek olan sağlıklı kişilerde EPC sayılarının azaldığı, koroner arter hastalarında da serum düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeyinin EPC sayısı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (64,29). Bununla beraber hiperlipidemi varlığında, EPC lerin proliferasyon, migrasyon, adhezyon gibi fonksiyonel özelliklerinde de bozulma görülmektedir (65).

2.6 Hipertansiyon ve EPC

Tüm risk faktörleri arasında, EPC migrasyon kapasitesi üzerine en etkili olan arteriyel hipertansiyondur. Arteriyel hipertansiyonu olan kişilerde, sistolik kan basıncı ile dolaşan EPC düzeyi ile ters orantılıdır. Yapılmış olan deneysel çalışmalarda, arteriyel hipertansiyonun etkilerinden sorumlu olan Angiotensin 2, oksidatif stresi artırarak EPC proliferasyon yeteneğinde bozulmaya neden olmuştur. Aynı çalışmada Angiotensin 2 reseptör blokörü (Valsartan) kullanımı ile, bu etkinin düzeldiği gösterilmiştir (66).

2.7 Diyabet ve EPC

EPC düzeyleri hem tip 1 hem de tip 2 diyabetiklerde azalmaktadır. Diyabetik hastalarda görülen vasküler komplikasyonların altta yatan mekanizmaları arasında EPC disfonksiyonunun önemli rolü olduğu düşünülmektedir. EPC proliferasyonu ve adhezyonu diyabetik hastalarda bozulmaktadır (67–69). Krankel ve arkadaşlarını yaptığı bir çalışmada hipergliseminin EPC düzeyinde, NO sentezinde ve MMP–9 aktivitesinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (70).

2.8 Transplantasyon ve EPC

Böbrek nakil sonrasında kardiyovasküler ölüm (KVÖ) oranı 10 kat azalmakta ve bu durum organ nakli sonrasında görülen artmış hasta sağkalım oranının en önemli sebebini oluşturmaktadır (71). Bu olumlu etkiye rağmen KVÖ, böbrek nakli hastalarındaki en önemli ölüm sebebi olmaya devam etmektedir. Nakil sonrası KVÖ oranları sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında 3-5 kat daha yüksektir (72,73). Böbrek nakli sonrasında artmış KVÖ oranlarından klasik risk faktörleri kadar nakil olmuş hastalara özgü faktörler de önemlidir. Bu risk faktörleri arasında kullanılan immünsüpressif ilaçlar, graft fonksiyonu (74), geçirilmiş cytomegalovirüs (CMV) enfeksiyonları (75) ve geçirilmiş akut rejeksiyon atakları yer almaktadır.

Endotel hücreleri, transplantasyon işlemi başarısında önemli rol oynamaktadır. Transplantasyon işleminin kendisi endotel hasarı yaparak inflamatuvar bir döngünün başlamasına sebep olmaktadır. Eğer bu inflamatuvar döngü kontrol altına alınmazsa, kronik graft vaskülopatisine yol açabilecek proliferatif ve fibrotik sürecin başlaması kaçınılmaz olacaktır (76).

SDBY hastalarında EPC lerde sayısal ve fonksiyonel bozukluğun olduğu ve bu durumun artmış KVÖ oranları ile ilişkisini gösteren çalışmalar olmasına karşın, böbrek nakli sonrasında EPC sayı ve fonksiyonlarında nasıl bir değişiklik meydana geldiğini ve bunun KVÖ oranları ile ilişkisini gösteren literatürde yayınlanmış tek bir çalışma vardır.

Bu çalışmada, nakil sonrasında EPC sayısında azalma olmasına karşın EPC fonksiyonlarında belirgin düzelme olduğu ve bu olumlu etkinin nakil sonrası azalmış KVÖ oranları ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (77).

2.9 EPC ve Rapamisin:

Rapamisin (RAPA); son 5 yılda transplantasyon sonrası organ reddini engellemede kullanımı giderek artan yeni bir immünsüpressif ilaçtır. Tek başına kullanılabileceği gibi düşük doz kalsinörin inhibitörleri ile beraber kullanımı da söz konusudur. RAPA kimyasal yapı olarak Tacrolimus ile benzerlik gösteren, antifungal etkileri de olan makrolid yapılu bir antibiyotiktir (78). Ön-ilaç olan RAPA nın etkisi T-lenfosit sitozolünde yer alan FK binding protein (FKBP12) ile bağlandıktan sonra başlar. RAPA-FKBP 12 kompleksi, T-lenfositlerdeki hücre proliferasyonu, differansiyasyonu ve yaşam süresini belirlemede önemli rol oynayan kinaz yapısında "mammalian target of rapamycin" (mTOR) enzimini inhibe eder (78). mTOR enzimi hücre büyümesi için gerekli olan yapıtaşlarının miktarı, hücresel enerji düzeyi ve büyüme faktörlerine ait sinyal iletilerini kontrol eder (79). Bu 3 temel girdi istenen düzeyde ise hücre proliferasyonu ve büyümesini başlatan uyarıyı gönderir. mTOR enzimi ayrıca büyüme faktörlerine ait reseptörlerin uyarılması ile oluşan sinyal iletiminde de görev alır (80). mTOR enzimi hücre içi ribosomal protein sentezini kontrol ederek mRNA translasyonunu uyarır ve hücre proliferasyonu için kritik bir aşama olan DNA sentezi için hücrelerin istirahat fazı olan G1 fazından sentez fazı olan S fazına geçişini uyarır (81).

RAPA; mTOR enzimini inhibe ederek lenfositler başta olmak üzere proliferasyon indeksi yüksek tüm hücrelerde, hücre çoğalması ve büyümesini inhibe eder. RAPA transplantasyonda organ reddini önleme dışında kalp nakillerinde koroner vaskülopati gelişimini engellemede (82), koroner stentlere emdirilerek re-stenozu

engellemede (83) ve anti proliferatif etkileri sebebiyle anti-neoplastik bir ajan olarak da kullanılmaktadır (84). RAPA 'nın bu etkileri vasküler endoteldeki neo-intimal hiperplazi ve angiogenezis üzerindeki etkilerine bağlıdır.

Son yıllarda RAPA nın özellikle dolaşan EPC ve vasküler düz kaslar üzerindeki anti-proliferatif etkileri ve bu etkinin tedavi amaçlı kullanımı gündeme gelmiştir. Bu konuda Miruika ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, in-vitro ortama çok düşük konsantrasyonlarda dahi RAPA eklenmesinin EPC sayısında ve canlı hücre yüzdesine dramatik bir azalmaya yol açtığını göstermişlerdir (85). Bu araştırmacılar EPC lerin RAPA etkisine çok duyarlı olduğunu oysa matür endotel hücreleri ve makrofajların RAPA etkisine göreceli olarak dirençli olduğunu da göstermişlerdir. Araştırmacılar RAPA nın EPC lerde apoptozisi ve otofaji olarak adlandırılan hücrelerin büyüme faktörü ve yapıtaşı eksikliğinde kendi kendilerini fagosite etmeleri fenomenini uyardığını ve böylece anti-proliferatif etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (85). RAPA ayrıca kalp transplantlarından sonra koroner arter sisteminde görülen ve transplant vaskülopatisi olarak isimlendirilen neointimal hiperplaziye bağlı koroner plakların oluşumunu da engeller (83). Transplant vaskülopatisi sürekli ve tekrarlayan donör spesifik immünolojik yanıtla ilgili olarak vasküler endotelde meydana gelen bir hasar sonucu oluşur. Bu hasarı tamir mekanizmasında görev alan EPC lerin aşırı yanıtı koroner transplant vaskülopati patogenezinde suçlanmaktadır. RAPA'nın; EPC sayı ve fonksiyonlarını bozarak ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu engelleyerek transplant vaskülopati gelişimini engellediği öne sürülmüştür (86). Ancak transplantasyon sonrasında RAPA kullanımı ile, fizyolojik hasar mekanizmasında önemli rolleri olan ve kardiyovasküler sistem hastalıklarının gelişimini engelledikleri düşünülen EPC'lerin sayı ve fonksiyonlarında meydana gelen bozulmanın uzun vadeli etkisinin nasıl olacağı henüz bilinmemektedir.

2.10 EPC ve HMG-CoA Redüktaz İnhibitörleri:

Statinler olarak bilinen HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan ilaçlar kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağını inhibe ederek kolesterol oluşumunu engellerler ve hiperlipidemi tedavisinde kullanılırlar. Koroner arter hastalığı olan kişilerde, statin kullanımı, ölüm ve iskemik kardiyovasküler hastalık gelişim sıklığını uzun dönemde azaltmaktadır. Statin kullanımı esas olarak mevcut aterosklerotik plak stabilizasyonu yaparak ve yeni aterosklerotik plak oluşumunu engelleyerek etki gösterir. Ancak bu etkisinin dışında, vasküler inflamasyonun azaltılması, trombosit agregasyonunun ve trombus oluşumunun engellenmesi ve endotel nitrik oksid üretimini artırması gibi farklı mekanizmalar üzerinden de etkili olduğu gösterilmiştir. Son yapılan çalışmalarda ise, kolesterol düzeyi normal olan bireylerde iskemik dokuda neovaskülarizasyonu arttırdığı ve bu olumlu etkilerinin endotel hücre fonksiyonlarını düzeltmeleri, vasküler düz kas hücre proliferasyonunu engelleyerek neointima oluşumunu engellemeleri ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (87,88).

Son yıllarda statinlerin iskemik doku modellerinde, endotel hücrelerinde mitojenik etki gösteren pek çok sitokin ve adhezyon molekülüne benzer şekilde angiogenezisi ve neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir (89). Statinlerin endotel hücre hasarını tamir ederek re-endotelizasyonu uyarmalarının temel mekanizmasının, statinlerin EPC sayı ve fonksiyonları üzerindeki olumlu etkilerinden kaynaklandığını gösteren çalışmalar giderek artan sayıda yayınlanmaktadır (89,90).

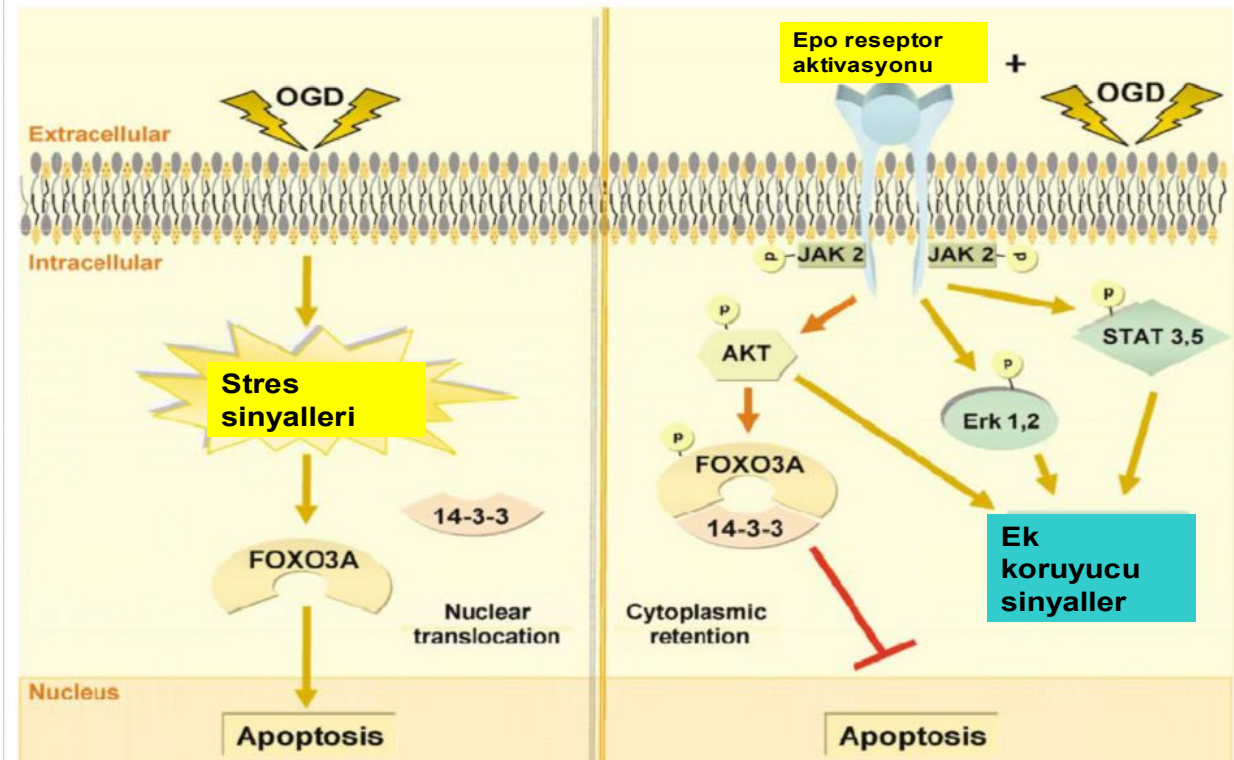
Yapılan çalışmalarda statinlerin, EPC modülasyonunda rol alan sitokinler gibi etki ettikleri gösterilmiştir. Angiogenik büyüme faktörlerinin prototipi olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) , diferansiye olmuş endotel hücreleri üzerine mitojenik etki göstererek neovaskülarizasyonu uyarmaktadır. Son yapılan çalışmalarda VEGF in ayrıca, kemik iliğinden EPC mobilizasyonunu uyarmada etkili olduğunu gösterilmiştir. VEGF in EPC mobilizasyonunda kullandığı sinyal iletim yolunun statinler tarafından da aktive edildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. VEGF uyarısıyla aktive olan ve Protein kinaz B olarak da bilinen serin-treonin protein kinaz Akt, ilk olarak normal hücrelere transforme olabilen bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise, büyüme faktörü yokluğunda hücre ölümünü engelleyen anti-apoptotik bir protein olduğu

gösterilmiştir. Yakın zamanda ise, kardiyovasküler olaylarda sitoprotektif etkileri olduğu öne sürülmüştür. Bu etkilerinin yanısıra, VEGF uyarısına cevap olarak, endotel hücrelerinde NO üretimini arttırdıkları ve endotel progenitör hücre mobilizasyonunu ve migrasyonunu uyardıkları gösterilmiştir. Kureishi ve arkadaşlarını yaptığı bir çalışmada, simvastatinin Akt sinyal yolunu hızlıca aktive ettiği, NO üretimini arttırdığı, apoptosisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Llevadot ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise, simvastatinin Akt sinyal yolunu kullanarak EPC proliferasyonu ve migrasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Statinlerin ayrıca EPC lerin hasarlı endotel bölgesine yerleşmesinde önemli rolü olan adhezyon moleküllerine ait EPC üzerindeki integrin ve fibronektin reseptörlerinin ekspresyonunu da arttırdıkları gösterilmiştir (91). Bütün bu çalışmaların sonucuna dayanarak, iskemik doku hasarı tamiri ve neovaskülarizasyonda terapötik amaçlı statin kullanımına dair çalışmalar devam etmektedir.

2.11 EPC ve Eritropoetin:

Eritropoetin (EPO) eritrosit diferensiyasyonunu stimüle eden ve hipoksik uyarı varlığında esas olarak renal interstisyumda üretilen bir sitokindir. Rekombinant insan eritropoetini (rhEPO) ,esas olarak kronik böbrek yetersizliğinde anemi tedavisi amacıyla kullanılmaktadır.

Son yapılan çalışmalarda EPO'nun ayrıca endotel hücreleri üzerinde direkt biyolojik etkileri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca EPO ve VEGF, neovaskülarizasyonda önemli ortak aktivitelere sahiptirler. Bu sitokinlerin, matür endotel hücreleri ve EPC üzerine etkili oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Matür endotel hücreleri yüzeylerinde EPO reseptörleri taşırlar (92). EPO; reseptörlerine bağlandıktan sonra Janus kinaz (JAK) ve AKT sinyal iletim yollarını kullanarak endotel hücrelerinde anti-apoptik, promigratuar, proliferatif etkilere ve NO sentezinde artışa yol açar (93,94). EPO ayrıca; dolaşımdaki kemik iliği kökenli EPC sayısını da artırır (95). Bu nedenle son yıllarda neovaskülarizasyonda EPO nun terapötik kullanımına dair çalışmalar devam etmektedir (figür 7).



Figür 7: Eritropoetin endotel hücreleri üzerine etki mekanizması

3. MATERYAL-METOD:

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Hayvan Deneylei Araştırma Laboratuvarında Ocak 2008 ve Şubat 2008 tarihleri arasında gerçekleştirilmiş, deneysel, prospektif, randomize bir çalışma olup, çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan Araştırma Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Etik kurul onay tarihi: 09.01.2008

Etik kurul onay numarası:32.2007mar

3.1. Çalışmada kullanılan hayvanlar:

Çalışmada, Marmara Üniversitesi Hayvan Araştırma Laboratuvarından temin edilen Wistar cinsi, ortalama ağırlıkları 300–350 gram olan erkek sıçanlar kullanılmıştır. Laboratuvar sıçanı ile ilgili genel bilgiler tablo 2’ de özetlenmiştir.

Tablo 2: Laboratuvar sıçanı ile ilgili genel bilgiler

Yaşam süresi:	2,5–3,5 yıl
Ortalama vücut ağırlığı	Erkek:450–520 gr. Dişi:250–300 gr.
Meme bezleri:	6 çift
Gıda alımı:	5–6 gr/100 gr vücut ağırlığı/gün
Su alımı:	10–12 ml/100 gr vücut ağırlığı/gün
İdrar hacmi:	5,5 ml/100 gr.vücut ağırlığı /gün
Ortalama solunum hızı:	92 /dk.(80–100)
Ortalama kalp hızı:	350 /dk (260–450)
Ortalama kan basıncı:	116 /90 mmHg

3.2. Çalışma Grupları:

Çalışmanın başında bir hafta sodyumdan fakir diyetle beslenen 24 adet sıçan, bu sürenin sonunda her grupta altışar adet olacak şekilde toplam dört gruba ayrılmıştır. Uygun ısı ve ışığın sağlandığı kafeslerde altılı gruplar halinde bulunan sıçanların çalışma süresi boyunca suya erişimleri kısıtlanmamıştır. Çalışma süresi 35 gün olarak belirlenmiştir.

Grup 1: Kontrol grubu.

0,5 cc. serum fizyolojik (SF), intraperitoneal enjeksiyon + 0.5cc SF oral gavaj

Grup 2: Rapamisin grubu

Rapamisin 1 mgr/kg/gün oral gavaj

Grup 3: Rapamisin+ Statin grubu

Rapamisin 1 mgr/kg/gün oral gavaj + Statin 10 mgr/kg/gün oral gavaj

Grup 4: Rapamisin+Eritropoetin Grubu

Rapamisin 1mgr/kg/gün oral gavaj + Eritropoetin alfa 1000 Ünite/kg/hafta intraperitoneal enjeksiyon

3.3.İlaçların hazırlanması ve uygulanması:

Rapamisin (Sirolimus) :

Rapamisin 1 mgr. film tabletlerden günlük toplam 10 tablet (10 mgr) , 10 cc. serum fizyolojik ile sulandırılarak, 1 cc. solüsyon içinde 1 mgr. rapamisin dozu elde edilmiştir. Her uygulama öncesinde hayvanlar tartılmıştır ve rapamisin dozu 1 mgr/kg olacak biçimde, hayvanlar işlem öncesinde eter anestezisi ile uyutulduktan sonra pediatrik boy feeding tüp kullanılarak, orogastrik olarak ilaç uygulanmıştır.

Atorvastatin:

Lipitor 20 mgr .film tabletlerden günlük toplam 3 tablet (60 mgr) , 6 cc. serum fizyolojik ile sulandırılarak , 1 cc. solüsyon içinde 10 mgr. atorvastatin dozu elde edilmiştir. Her uygulama öncesinde hayvanlar tartılmıştır ve statin dozu 10 mgr/kg olacak biçimde, hayvanlar işlem öncesinde eter anestezisi ile uyutulduktan sonra pediatrik boy feeding tüp kullanılarak, orogastrik olarak ilaç uygulanmıştır.

Eritropoetin alfa:

Eprex 2000 Ünite 1 cc. lik flakon formu (Santa-Farma ilaç firması), her uygulama öncesinde hayvanlar tartılarak, eritropoetin dozu 1000 Ünite/kg/hafta olacak şekilde haftada 2 gün insülin enjektörü ile, karın ön yüzünden, intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır.

Çalışma süresi boyunca, su ve gıda kısıtlaması yapılmayan hayvanların çalışma boyunca günlük kilo takibi yapılarak, gelişebilecek yan etkiler açısından yakından takip edilmişlerdir.

3.4. Örneklerin toplanması:

Çalışma sonunda tüm gruplardaki sıçanlar doku ve kan örneklerinin değerlendirilmesi amacıyla sakrifiye edilmişlerdir. Sakrifikasyon için 50 mgr/ kg dozunda ketamin anestezisi uygulanmıştır. Anestezi işlemi sonrasında batın orta hattan yapılan insizyonla karın boşluğuna girilerek vena cava inferior'dan yaklaşık 5 cc. kan örneği EDTA 'lı ve kuru tüplere alınmıştır. Daha sonra böbrekler künt disseksiyon ile çıkarılmış ve %10 formol solüsyonuna konmuştur. Son olarak abdominal aorta klempleri açılarak denekler sakrifiye edilmiştir.

Kan örnekleri alındıktan sonra en geç 2 saat içinde MÜTFH Hematoloji ve İmmünoloji Laboratuvarında değerlendirmeye alınmıştır.

3.5. Değerlendirilecek Parametreler:

a)Kilo: Çalışmanın sonunda gruplar kiloları açısından değerlendirilmiştir.

b)Kan örnekleri: Alınan kan örneklerinden, hemogram ve flow-sitometrik olarak matür endotel hücresi ve endotel progenitör hücre sayımı yapılmıştır.

3.6.Örneklerin değerlendirilmesi:

a) Hemogram değerlendirilmesi

MÜTFH Hematoloji Laboratuvarında, Beckmann- Coulter hemogram cihazı kullanılarak, EDTA lı tüplere alınan örneklerin hemogram değerlendirmesi yapılmıştır.

b) Flow-sitometrik ölçümler:

Flow-sitometrik değerlendirme, sıçanlardan alınan taze kan örneklerinde (kan alındıktan sonraki ilk bir saat içinde) yapılmıştır. Matür endotel hücrelerinin tayini için CD 45 (FITC işaretli) , CD34 (Phyco-erythrin PE-Cy7 işaretli) ve Flk-1 (sekonder antikorla işaretli-PE) anti-rat antikorları kullanılmıştır. Endotel progenitör hücre değerlendirmesi amacıyla CD 133 (sekonder antikorla işaretli, FITC), CD 34 (PE-Cy7 işaretli) anti-rat antikorları kullanılmıştır.

Her hayvan için 2 adet EDTA lı tüp kullanılmış olup, tüplere 2cc. kan örneği konulmuştur. Eritrositleri parçalamak için, hipertonic eritrosit lizatı kullanılmıştır. Yaklaşık 4 cc. kan örneği, 35 cc. eritrosit lizatı ile 10 dakika inkübe edildikten sonra 800 rpm hızında 10 dakika santrifüje edilmiş, sonrasında sedimentin üstünde kalan kısım dökülerek parçalanmış eritrositler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. PBS (phosphate-buffer) solüsyonu eklenerek 1500 rpm de 10 dakika çevrildikten sonra tekrar sedimentin üstünde kalan kısım dökülerek, mononükleer hücreler elde edilmiştir.

Her örnek için toplam 3 adet kuru tüp hazırlanmıştır. Birinci tüpe 1 mikrolitre Flk-1 (mouse monoklonal IgG1- Santa Cruz), 2. tüpe 1 mikrolitre CD 133 (goat polyclonal anti-rat IgG- Santa Cruz) konulmuştur. 3. tüp, kontrol tüpü olarak kullanılmıştır ve herhangi bir antikor konulmamıştır. Her 3 tüpe, 100 mikrolitre mononükleer hücre eklendikten sonra 30 dakika karanlıkta bekletilmiş ve PBS ile 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. 1. tüpe 1 mikrolitre phycoerythrin(PE) (goat anti-mouse IgG1- Santa-Cruz), 2. tüpe 1 mikrolitre FITC (donkey anti-goat IgG-FITC) eklenerek tekrar 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. PBS ile 1500 rpm de 10 dakika yıkandıktan sonra 1. tüpe 1 mikrolitre CD 45 (FITC işaretli, Santa-Cruz) ve CD34 (PE Cy7 işaretli, Santa –Cruz), 2. tüpe 1 mikrolitre CD 34 (PE Cy7 işaretli, Santa –Cruz) eklenmiştir. 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen örnekler İmmünoloji Laboratuvarında bulunan FACS (Flow-sitometrik analyser) cihazı kullanılarak flow sitometrik olarak değerlendirilmiştir. Flow- sitometrik değerlendirmede her örnek için yaklaşık 500.000 hücre sayılmış ve matür endotel hücresi ve EPC sayısı kantitatif olarak değerlendirilmiştir. . Bulunan değerler her örnek için, kendi lökosit sayısına göre oranlanarak mutlak rakamlar elde edilmiştir.

3.7.İstatistiksel Değerlendirme:

Tek Yönlü ANOVA:

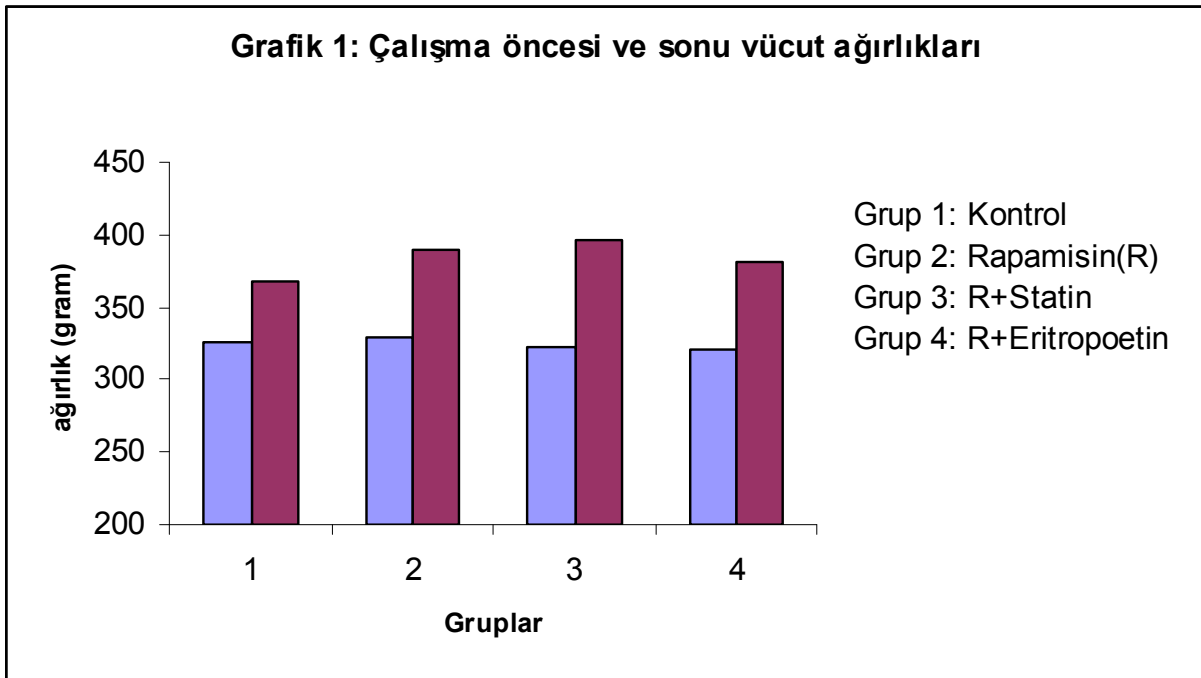
Nicel verilerin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Dört bağımsız grup, parametreler açısından ortalama değerlerine göre karşılaştırılmıştır. Sonuçlarda $p < 0,05$ olması anlamlı farklılık olarak değerlendirilmiştir. Bu durumda non-parametrik Mann-Whitney U testi kullanılarak, oluşan farkın hangi gruplar arasında olduğu değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR:

Çalışmamızda, 35 günlük tedavi sonrasında, tüm gruplardaki hayvanların kiloları ve kan örnekleri değerlendirilmiştir. Alınan kan örneklerinde hemogram parametreleri (hemogloblin değerleri ve lökosit sayıları) ve flow-sitometrik yöntemle matur endotel hücreleri ve endotel progenitor hücreleri değerlendirilmiştir. Tüm tedavi tipleri, hayvanlar tarafından rahat tolere edilmiştir.

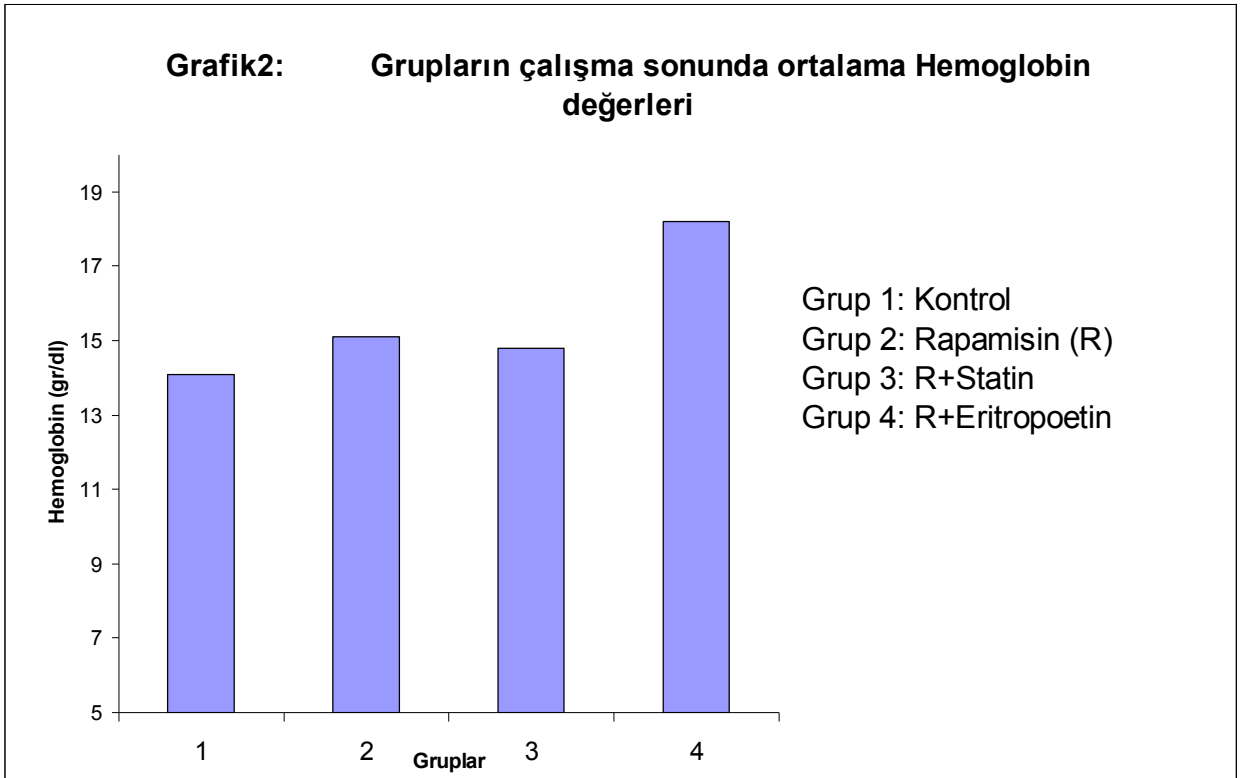
Kilo değerlendirmesi:

Çalışma başında grupların ortalama vücut ağırlıkları arasında anlamlı fark saptanmamıştır. (Grup 1 326±16 gr., Grup 2 330±18 gr., Grup 3 322±16 gr., Grup 4 320 ± 18). Çalışma sonunda tüm grupların vücut ağırlıklarının bazale göre arttığı saptanmıştır. Grup 2,3 ve 4'ün çalışma sonu vücut ağırlıkları, Grup1' e göre daha yüksek bulunmakla beraber fark istatistiksel anlama ulaşmamıştır (sırasıyla 390±15, 396±14, 381±16 vs 368±15, p>0,05) (grafik 1)



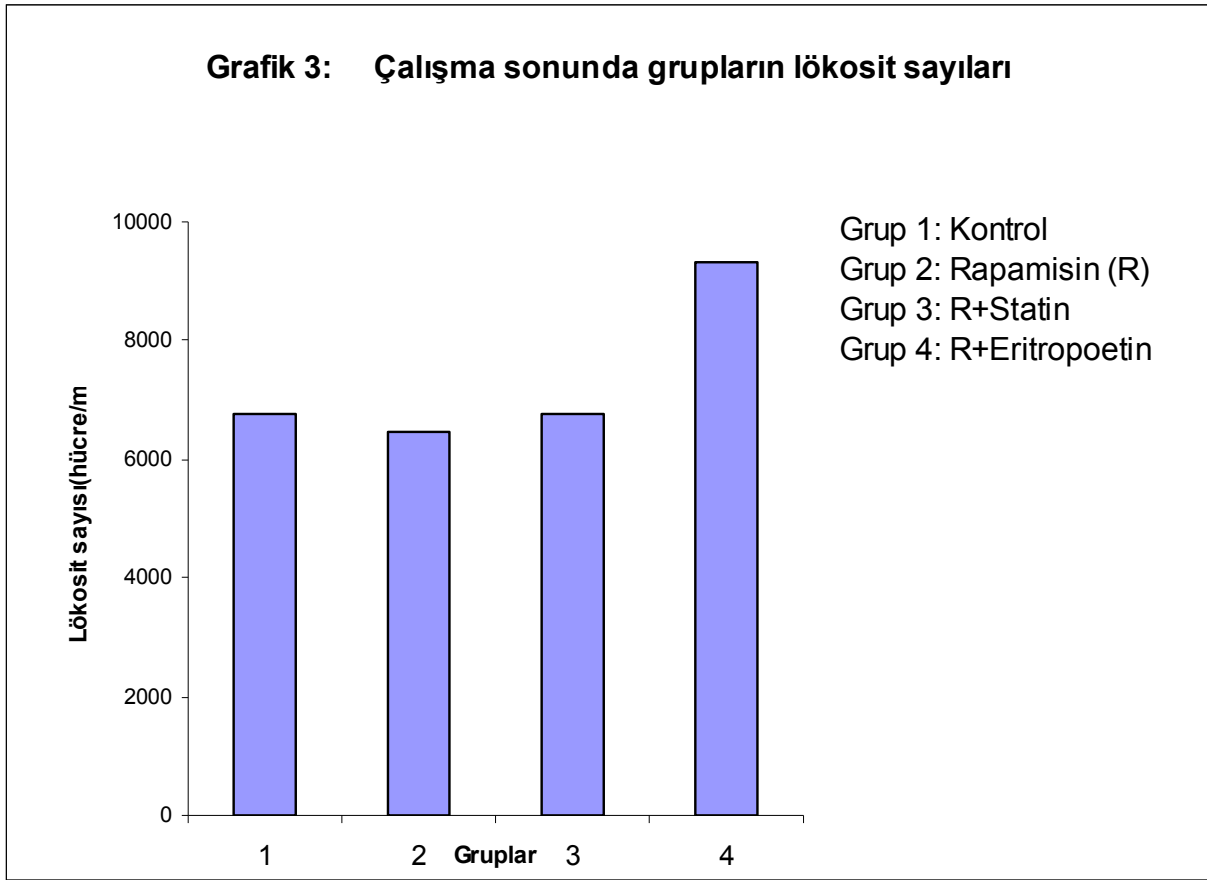
D2- Hemoglobin değerlendirmesi:

Çalışmanın sonunda hemoglobin(Hgb) değerleri açısından gruplar karşılaştırılmıştır. Grup 4'ün Hgb değerleri, Grup 1, 2 ve 3'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla $18,2 \pm 1,63$ gr/dl, $14,1 \pm 2,14$ gr/dl, $15,1 \pm 0,64$ gr/dl, $14,8 \pm 1,37$ gr/dl, $p < 0,05$). Diğer gruplar arasında Hgb değerleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır (Grafik 2).



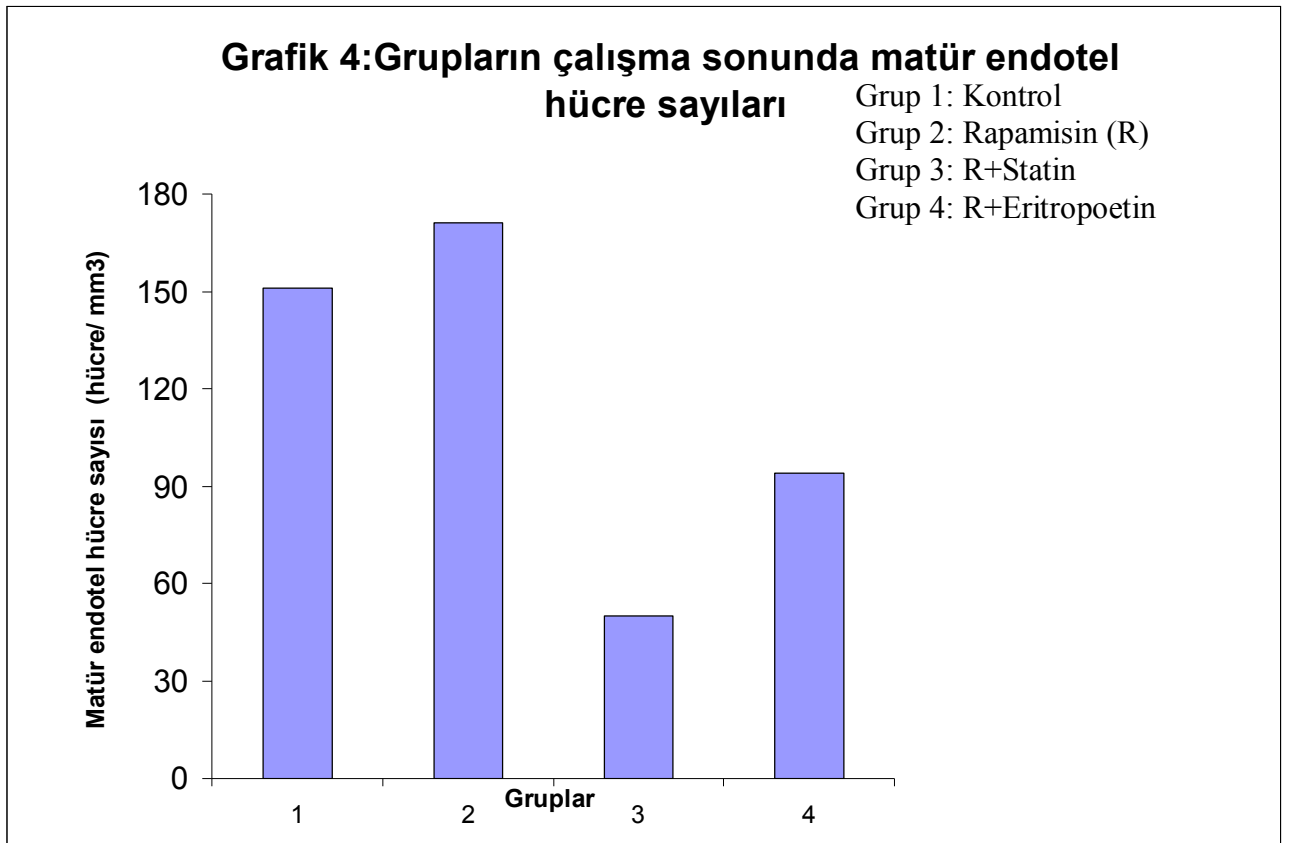
Lökosit sayılarının değerlendirilmesi

Çalışmanın sonunda Lökosit değerleri açısından gruplar karşılaştırılmıştır. Grup 4'ün lökosit sayısı, Grup 1, 2 ve 3'e göre daha yüksek saptanmış ancak istatistiksel anlama ulaşamamıştır. Grupların lökosit değerleri Grafik 3'de gösterilmiştir.



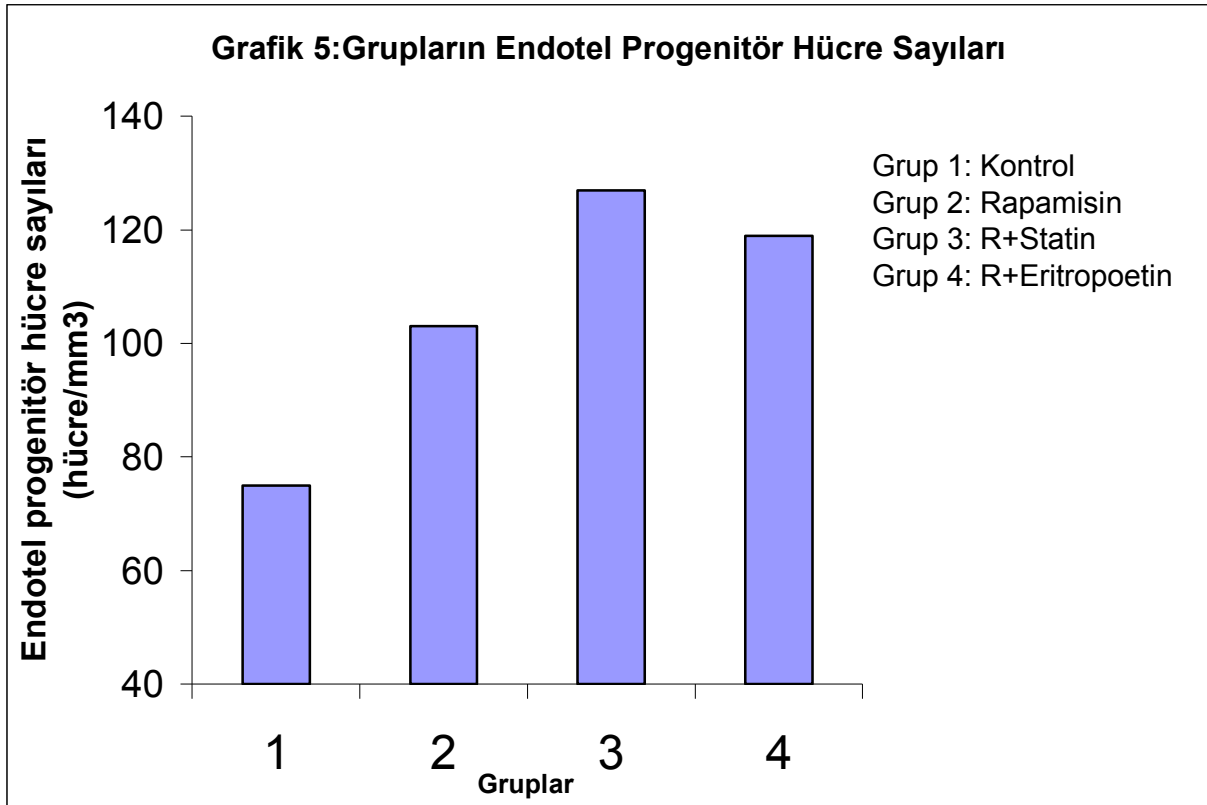
Matür endotel hücre sayılarının değerlendirilmesi

Çalışmanın sonunda CD 45⁺ CD34⁺ ve Flk-1⁺ matür endotel hücre sayıları açısından gruplar değerlendirilmiştir. . Matür endotel hücre sayısı ortalama \pm standart ortalama hata (\pm SEM) olarak gösterilmiştir. Grup 2'nin matür endotel hücre sayısı, Grup 1'e göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı (sırasıyla 171,42 \pm 5,67 vs 151,04 \pm 11,44, p<0,05). Grup 3'ün matür endotel hücre sayısı, Grup 1, 2 ve 4 'e göre anlamlı olarak düşük olarak saptandı (sırasıyla 50,59 \pm 9,06 vs 151,04 \pm 11,44, 171,42 \pm 5,67 ve 94,36 \pm 4,66 p<0.001). Grup 4 matür endotel hücre sayısı, Grup 1 ve 2 'ye göre anlamlı olarak düşük saptandı (94,36 \pm 4,66 vs 151,04 \pm 11,44, 171,42 \pm 5,67, p<0.001). Grup 4 endotel progenitör hücre sayısı, Grup 3'e göre anlamlı olarak yüksek saptandı (94,36 \pm 4,66 vs 50,59 \pm 9,06, p<0.001). (Grafik 4)



Endotel progenitör hücre sayılarının değerlendirilmesi

Çalışmanın sonunda CD34⁺ ve CD 133⁺ endotel progenitor hücre (EPC) sayıları açısından gruplar değerlendirilmiştir. EPC sayısı ortalama \pm standart ortalama hata (\pm SEM) olarak gösterilmiştir. Grup 2'nin EPC sayısı, Grup 1'e göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı (sırasıyla 103 \pm 6,85 vs 75 \pm 4,11, p<0,05). Grup 3 ve 4'ün EPC sayısı, Grup 1 göre anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla 127 \pm 8,64, 119 \pm 8,4 vs 75 \pm 4,11, p<0.05). Grup 3 ve 4'ün EPC sayıları, Grup 2'ye göre artmış olarak saptandı ancak fark istatistiksel anlama ulaşamadı (sırasıyla 127 \pm 8,64, 119 \pm 8,4 vs 103 \pm 6,85, p>0.05). EPC sayılarında Grup 3 ve 4 arasında anlamlı fark görülmedi (Grafik 5)



5.TARTIŞMA:

Çalışmamızda, rapamisin ile mTOR inhibisyonu yapılan sıçan modeli kullanılarak, statin ve eritropoetin tedavisinin matür endotel hücreleri ve endotel progenitör hücreleri üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonunda, rapamisin uygulaması literatürden farklı olarak endotel progenitör hücre sayısında belirgin bir azalmaya sebep olmamıştır. Rapamisin ile beraber statin veya eritropoetin uygulaması sonucunda ise tek başına rapamisin uygulanan gruba göre endotel progenitör hücre sayılarında artış gözlenmiştir. Çalışmamızın önemli sonuçlarından birisi de rapamisin tedavisiyle, endotel hasarının bir göstergesi olan matür endotel hücre sayısında artış saptanmasıdır. Rapamisin ile beraber statin veya eritropoetin uygulaması sonucunda ise, dolaşımda bulunan matür endotel hücre sayısında belirgin azalma sağlanmıştır. Çalışmamızda elde edilen veriler, immünsüpresif tedavide kullanılan rapamisinin, endotel hasarına yol açarak uzun vadede kardiyovasküler hastalıklara zemin hazırlayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın sonucunda endotel hasarını azaltan ve endotel progenitör hücre sayısında artışa yol açan statin ve eritropoetin ise uzun vadede kardiyovasküler sistem hastalıklarının azaltılmasında etkili olabilir.

Çalışmamızda, sıçanlara 35 gün boyunca 1 mg/kg/gün dozunda rapamisin tedavisi uygulanmıştır. Rapamisin, klinikte lenfositlerin proliferasyonunu inhibe ederek etki gösteren antiproliferatif bir immünsüpresandır. Ancak rapamisinin farklı mekanizmalar kullanarak, değişik hücreler üzerine sitotoksik etkilerinin de olduğu gösterilmiştir (96).Önceki yapılan çalışmaların sonuçlarına göre rapamisin, apoptozisi ve proapoptotik sinyalleri indükleyerek, caspase aktivasyonuna yol açarak, ribozomal sinyal yollarını inhibe ederek endotel progenitör hücre sayı ve fonksiyonlarını azaltmaktadır (97-101). Butzal ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, lökoferez ile elde edilen CD133+ hücrelerin ortamına rapamisin konulmasıyla endotel progenitör hücre sayısında belirgin azalma saptanmıştır (102). Miriuka ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise farklı immünsüpresif ilaçların endotel progenitör hücreleri üzerine olan etkileri değerlendirilmiş ve rapamisinin klinikte kullanılan dozlarından çok daha düşük dozlarında dahi EPC sayısında anlamlı azalmaya

yol açtığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada rapamisin bu etkisinin, EPC ler üzerine etkili olan bazı büyüme faktörlerinin sinyal yollarının bloke etmesi sonucu ortaya çıktığı öne sürülmüştür (77). Ayrıca rapamisin özellikle erken dönem EPC üzerine toksik etkili olduğu ve periferik kan hücre kültüründen elde edilen matür endotel hücreleri ve makrofajlar üzerine aynı toksik etkiyi göstermediği düşünülmüştür (77) . Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, 35 günlük rapamisin uygulaması sonucunda literatürden farklı olarak periferik kan matür endotel hücre sayısında, kontrol grubuna oranla belirgin artış olduğu saptanmıştır. Bilindiği gibi normal şartlarda, periferik kanda damar duvarı kaynaklı endotel hücre sayısı oldukça düşüktür (1–3 hücre/ ml). Hâlbuki vasküler endotelde meydana gelen akut stres hasarına bağlı olarak endotel hücre apoptosisi meydana gelir ve dolaşan endotel hücre sayısında artış görülür. Daha önce yapılan çalışmalarda, in vitro ortamda rapamisin etkisi değerlendirildiği için klinikte kullanılan dozlardan çok daha düşük dozlar kullanılmıştır. Çalışmamızda, rapamisin uygulanan hayvanların ilaç kan düzeyi bakılmamıştır ancak, 35 gün boyunca sistemik olarak yüksek doz rapamisin tedavisi uygulanmıştır. Bu nedenle rapamisin yüksek doz uygulanmasının muhtemelen vasküler endotelde hasara sebep olarak, matür endotel hücre sayısında artışa neden olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca literatürden farklı olarak rapamisin uygulanan grupta endotel progenitör hücre sayısında, kontrol grubuna göre artış saptanmıştır. Rapamisin, yukarıda belirtildiği gibi farklı mekanizmaları kullanarak özellikle EPC üzerinde sitotoksik etki yaratmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda rapamisin sadece EPC sayısına değil, fonksiyonları üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda yüksek doz rapamisin uygulamasının endotel hasarına yol açtığı ve bunun da kemik iliğinden EPC mobilizasyonuna neden olduğu düşünülmüştür. Ancak kültür ortamında mevcut EPC lerin fonksiyonları çalışmamızda değerlendirilmediğinden, hasara yanıt olarak artmış olduğu düşünülen EPC fonksiyonları hakkında bilgi bulunmamaktadır.

Bilindiği gibi matür endotel hücreleri ileri derecede diferansiye olmuş ve düşük proliferatif kapasiteye sahip hücrelerdir. Vasküler hasar varlığında, matür endotel hücrelerine dönüşme kapasitesine sahip, kemik iliği kökenli ve embryonal angioblastlara benzer özellikler taşıyan endotel progenitör hücreler devreye girmektedir. Bu hücrelerin kemik iliğinden mobilizasyonu, farklı büyüme hormonları, yüzey reseptörleri ve farklı ligandlar tarafından düzenlenmektedir. (7,44). Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle farklı tedavi modalitelerinin in vivo olarak EPC sayılarını arttırdıkları gösterilmiştir. Bunlar arasında HMG-CoA redüktaz inhibitörleri, G-CSF -VEGF gibi büyüme faktörleri, eritropoetin ve östrojen yer almaktadır (32,90,103,7,58,104). Çalışmamızda rapamisin tedavisi ile beraber statin veya eritropoetin kullanımının EPC üzerine olan etkileri de değerlendirilmiştir.

Rapamisinle beraber eritropoetin alan grubun hemoglobin değerleri diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptandı. Eritropoetin tedavisi ayrıca lökosit sayılarında da yükselmeye sebep oldu ancak, bu fark gruplar arası istatistiksel anlamlı farka ulaşmadı. Bu etki muhtemelen eritropoetin eritroid seri dışında myeloid seri üzerine de olan etkisiyle açıklandı.

Çalışmamızda eritropoetin alfa 1000Unite/kg/hafta dozunda, hafta içinde iki doza bölünmüş olarak uygulandı. Rapamisin ile beraber eritropoetin alfa tedavisi alan grupta, matür endotel hücre sayısının, kontrol grubuna ve tekli rapamisin tedavisi alan gruba göre belirgin olarak azaldığı saptandı. Bu sonuç, yüksek doz rapamisin uygulaması sonucunda ortaya çıkan vasküler endotel hücre hasarının eritropoetin tedavisi ile azalabileceğini destekler niteliktedir.

Eritropoetin kronik böbrek yetersizliğine bağlı anemisi olan kişilerde anemi tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda eritropoetin yararlı etkilerinin, eritropoetin uyarılması dışında farklı mekanizmalarla öldüğü düşünülmüştür. 2002 yılında Chong ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada eritropoetin tedavisinin vasküler endotel iskemik hasardan koruduğu gösterilmiştir (105). Yakın zamanda yapılan farklı çalışmalarda ise, değişik vasküler hastalık modellerinde eritropoetin

tedavisi uygulanmış ve endotel hücreleri üzerine koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (106–108).

Chong ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada eritropoetin endotel hücre içine antiapoptotik sinyaller göndererek hücre apoptozisini engellediği gösterilmiştir (105). Ayrıca yapılan çalışmalarda eritropoetin ve eritropoetin reseptörünün düz kas hücreleri ve vasküler endotel gibi farklı dokularda da eksprese olduğu gösterilmiştir (109). Bu nedenle özellikle vasküler sistemin eritropoetin biyolojik etkilerinden önemli derecede etkilendiği düşünülmüştür. Özellikle hipoksi varlığında, transkripsiyon faktörü ve hipoksi-inducible faktör 1 aktivasyonu meydana gelir ve sonuç olarak hipoksi varlığında eritropoetin üretiminde artış olur. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak, yüksek doz rapamisin uygulaması sonrası muhtemel oluşmuş endotel hasarı, rapamisinin eritropoetin ile beraber uygulanması durumunda belirgin olarak azalmıştır.

Eritropoetin ile ilgili devam eden çalışmalarda, endotel üzerine olan koruyucu etkisinin mekanizmaları araştırılmış ve endotel hücreleri apoptozisini önlemesi dışında endotel progenitor hücre sayısı ve fonksiyonlarını düzelttiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Ferdinand ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kronik böbrek yetersizliğine bağlı anemisi olan hasta grubuna rhEPO tedavisi uygulanmış ve in vitro ortamda aktif EPC sayısı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak eritropoetin tedavisinin fonksiyonel aktif EPC sayısını arttırdığı gösterilmiştir (110). Aynı çalışmada eritropoetin EPC lerde Akt protein kinaz yolu aktivasyonu yaparak etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada eritropoetin klinikte kullanılan dozlarda EPC üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Aynı grubun yapmış olduğu farklı bir çalışmada da darbepoetin kullanılmış ve hem EPC proliferasyonunda hem de diferansiasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (111). Urao ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise femoral arter hasarı yapılmış hayvan modelinde 3 günlük EPO uygulaması sonrasında, damar reendotelizasyonun arttığı ve dolayan EPC sayısında artış olduğu gösterilmiştir (112). Çalışmamızda rapamisin alan grupta literatürde beklendiği gibi EPC sayısında azalma saptanmamıştır, ancak eritropoetin beraber uygulanması sonucunda tekli rapamisin alan gruba oranla EPC sayısı daha yüksek saptanmış ancak beklenen anlamlı yükselme elde edilememiştir. Bu durum birden farklı mekanizmayla açıklanabilir. Rapamisin muhtemelen ciddi endotel hasarı

yaparak eritropoetin etkisini baskılamış olabilir. Bununla beraber kullandığımız eritropoetin dozu, rapamisin etkilerini düzeltmek için yetersiz kalmış olabilir, daha yüksek doz eritropoetinle EPC sayısında beklenen artış belki saptanabilirdi. Çalışmamızın eksik tarafı, hücre kültürü yapılarak EPC fonksiyonlarında değerlendirmenin yapılmamış olmasıdır. Çünkü biliyoruz ki, EPC üzerine etkili olduğu düşünülen ajanlar, sadece sayısal değil fonksiyonel düzelmeye de neden olmaktadır. Fonksiyonel düzelmenin tespiti ise ancak hücre kültürü ile mümkündür. Bu nedenle eritropoetin muhtemelen EPC fonksiyonlarında düzelmeye yol açmış olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızın bir diğer grubunda ise, vasküler koruyucu özellikleri son yıllarda öne çıkan HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin (statin) etkileri değerlendirilmiştir. Bu grubun çalışma sonunda hemoglobin ve lökosit sayıları kontrol grubuna benzer olarak bulunmuştur. Statin hemogram parametreleri üzerine herhangi bir etki göstermemiştir. Rapamisin ile beraber statin uygulanan grubun periferik kan matür endotel hücre sayısı, kontrol grubuna ve tekli rapamisin alan gruba göre anlamlı olarak azalmıştır. Çalışmanın sonucuna göre rapamisinle beraber statin uygulaması, rapamisinin matür endotel hücreleri üzerine olan etkisini azaltmaktadır. Bununla beraber, statin uygulaması sonucunda, dolaşan endotel progenitör hücre sayısında kontrol grubuna oranla belirgin artış saptanmıştır. Rapamisinle beraber statin uygulanan grubun EPC sayıları, tekli rapamisin ve rapamisinle beraber eritropoetin tedavisi alan gruba göre de yüksek saptanmıştır. Bu fark gruplar arası anlamlı farklılığa yol açmamış olmakla beraber, örnek sayısının yetersizliği ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Yakın zamanda in vivo ve in vitro ortamda yapılan birçok çalışmada statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak endotel fonksiyonunda iyileşmeye sebep oldukları gösterilmiştir (88,113) . Ayrıca bazı in vivo çalışmalarda statinlerin, endotel hücre mitojenleri gibi, angiogenezisi stimüle ettikleri gösterilmiştir (48,89) (3–11,12). Statinlerin vasküler endotel üzerine olan koruyucu etkilerinin, EPC sayıları üzerine olan etkilerinden kaynaklandığını düşündüren çalışmalar giderek artmaktadır. Llevadot ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kemik iliğinden EPC mobilizasyonun ve EPC yaşam süresinin simvastatin tedavisiyle belirgin artış gösterdiği saptanmıştır (90). Dimmeler ve arkadaşlarının yaptığı farklı bir çalışmada ise statinlerin Akt (P13k/Akt) sinyal yolunu aktive

ederek EPC diferansiasyonunu ve sayısını arttırdıkları gösterilmiştir. Aynı çalışmada farmakolojik P13K blokerlerinin kullanılması, EPC diferansiasyonu ve sayısının azalmasına sebep olmuştur (4). Bütün bu çalışmaların sonucunda statinlerin vasküler endotel hasarını düzeltmede etkili ajanlar oldukları ve reendotelizasyonda rol aldıkları öne sürülmüştür. Çalışmamızın sonuçları literatürle uyumlu olup, statin tedavisiyle EPC sayılarında artış saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda immünsüpresif tedavide kullanılan rapamisinin endotel üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda özellikle endotel progenitör hücre sayısı ve fonksiyonları üzerine etkileri ön planda tutulmasına karşılık, çalışmamızda rapamisin uygulaması sonucunda dolaşan matür endotel hücre sayısında önemli bir artış saptanmıştır. Bu nedenle daha uzun dönemli ve EPC fonksiyonlarının değerlendirildiği çalışmalar gereklidir. Statin veya eritropoetin uygulaması ise, endotel hasarını anlamlı derecede azaltmış ancak endotel progenitör hücre sayısını istenilen düzeyde arttıramamıştır. Rapamisinin uzun dönem kullanımı endotel fonksiyonlarını etkileyerek, transplant sonrasında hasta kaybının en önemli nedeni olan kardiyovasküler hastalıkların gelişimine zemin hazırlayabilir. Bu nedenle, vasküler koruyucu etkiye sahip ilaçlarla beraber kullanımları uzun vadede koruyucu olup, kardiyovasküler sistem hastalıklarının gelişimini engelleyebilecektir.

6.ÖZET

Son dönem böbrek yetmezliğinde günümüzde en seçkin tedavi yöntemi böbrek nakli olup hasta ve graft survileri 5 yıllık takiplerde %80-85 arasındadır. Böbrek nakli sonrasında görülen graft kaybının en önemli sebebi çalışan graft ile hasta ölümüdür. Bu ölümlerin en fazla sebebi ise kardiyovasküler hastalıklardır. Böbrek nakli hastalarında graft fonksiyonu, kullanılan immünsüpresif ilaçlar, geçirilmiş akut rejeksiyon atakları ve CMV enfeksiyonları, klasik risk faktörleri dışında bu hasta grubuna özgü kardiyovasküler risk faktörleridir.

Son yıllarda KVS risk faktörleri varlığında gelişen endotel hasarını tamir etme yeteneği olduğu düşünülen, endotel progenitör hücre (EPC) adı verilen öncül hücreler tanımlanmıştır. EPC ler endotel hasarı olduğunda kemik iliğinden mobilize olarak, hasarlı endotel bölgesine ulaşmakta ve neo-vaskülarizasyon sürecini başlatarak morfolojik ve fonksiyonel endotel bütünlüğünü sağlamaktadır. Bu EPC adı verilen öncül hücrelerin kemik iliğinden mobilizasyonu ve hasarlı bölgeye yerleşmesine aracılık eden değişik sitokin, hormon ve sinyal iletim sistemleri olduğu gösterilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda immünsüpresif tedavide kullanılan ve antiproliferatif bir ajan olan rapamisin kullanımının, endotel progenitör hücrelerinde apoptozis yaparak, bu hücrelerin sayı ve fonksiyonlarında azalmaya neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu çalışmada deneysel hayvan modelinde yüksek doz Rapamisinin ve Rapamisin ile beraber Eritropetin alfa ve Atorvastatin uygulamasının endotel hasarı ve EPC sayıları üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda Rapamisin kullanımı ile belirgin endotel hasarı oluşmuş ve hasara yanıt olarak EPC sayılarında artış gözlenmiştir. Rapamisin ile beraber eritropetin ve statin uygulanan guplarda endotel hasarı göstergesi olan matür endotel hücre sayılarında sadece rapamisin uygulanan gruba göre anlamlı düşüş saptanmıştır. Bu bulgu, eritropetin ve statinin vasküler koruyucu etkileriyle açıklanmıştır. Bununla beraber statin ve eritropetin endotel progenitör hücre sayılarında da artışa neden olmuşlardır.

Sonuç olarak böbrek nakli sonrasında hasta ve greft kaybının en önemli sebebi olmaya devam eden kardiyovasküler nedenli ölümlerin azaltılması için klasik risk faktörlerinin yanısıra transplantasyona özgü risk faktörleri değerlendirilmelidir. Özellikle transplantasyon immnspresyonunda kullanılan ilaçlar, endotel hasarına yol açarak kardiyovasküler hastalık gelişiminde etkili olabilir. Uzun vadede bu ilaçlarla beraber vasküler koruyucu etkileri olduğu düşünülen ajanların birlikte kullanımı, KVS hastalıkları gelişimine karşı koruyucu olabilir.

7.SUMMARY

Renal transplantation is the treatment of choice in end stage renal disease due to improved patient and graft survival exceeding 85% at 5 years by modern therapies. The main reason for graft failure is death with a functioning graft commonly due to cardiovascular deaths. Graft function, donor organ quality, recipient age, CMV infection, acute rejection episodes, diabetes, hypertension, hyperlipidemia and smoking have all been considered as major cardiovascular risk factors in this population. Additionally; immunosuppressive drugs which are used after transplantation augment major cardiovascular risk factors as diabetes, hyperlipidemia and hypertension.

In the last ten years, a unique subset of mostly bone marrow derived stemcell population has been defined. These are endothelial progenitor cells (EPC) whose main function is to repair the endothelial damage and induce neo-vascularisation in ischemic tissues. There are many cytokines, hormones and signal transduction systems which play a major role in mobilisation of EPC from bone marrow, homing and incorporation into ischemic tissue and differentiate into mature endothelial cells.

Rapamycine is an antiproliferative agent used after transplantation for immunosuppression. Recently, some studies showed that rapamycine induces endothelial progenitor cell apoptosis and cell death. The aim of this study is to evaluate the effects of high dose rapamycine on mature endothelial cells and EPC numbers in circulation in a rat model. In addition; we evaluate the effects of erythropoietine-alpha and atorvastatin on mature endothelial cells and EPC separately in rats receiving rapamycine. At the end of the study, severe endothelial damage was observed in rats receiving rapamycine and EPC counts were significantly increased as response to the endothelial damage. Atorvastatin and erythropetin-alpha treatment significantly reduced the number of mature endothelial cells and increased the number of endothelial progenitor cells at the end of the study.

In conclusion, death with a functioning graft mostly as a result of cardiovascular diseases still remain to be the most important reason of unfavourable outcomes after renal transplantation. In addition to the major cardiovascular risk factors, immunosuppressive drugs used in transplantation may have effects on the pathogenesis of cardiovascular diseases. Use of vasculoprotective agents after transplantation may be effective for preventing cardiovascular diseases and mortality in this unique population.

8.LİTERATÜRLER:

1-Satyan S, Rocher LL. Impact of kidney transplantation on the progression of cardiovascular disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2004; 11: 274– 293.

2-Jonathan M. Hill, M.R.C.P., Gloria Zalos et al; Circulating endothelial progenitor cells, Vascular function and Cardiovascular risk, *The New England Journal of Medicine* 2003;348:593-600

3-Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y et al;HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow derived endothelial progenitor cells,*J Clin Invest* 2001 Aug;108(3):399-405

4-Dimmeler S,Aicher A, Vasa M et al; HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway:*J Clin Invest.* 2001 Aug;108(3):391-7.

5-Heeschen C, Aicher A, Lehmann R et al, Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization:*Blood.* 2003 Aug 15;102(4):1340-6. Epub 2003 Apr 17. Erratum in: *Blood.* 2004 Jun 15;103(12):4388.

6-Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM et al,Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells:*Blood* 2004 Feb 1;103(3):921-6. Epub 2003 Oct 2.

7-Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al :Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization:*Nat Med.* 1999 Apr;5(4):434-8.

8-Iwakura A, Luedemann C, Shastry S et al.:Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury:Circulation. 2003 Dec 23;108(25):3115-21. Epub 2003 Dec 15.

9-Strehlow K, Werner N, Berweiler J et al.:Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. Circulation. 2003 Jun 24;107(24):3059-65. Epub 2003 Jun 16

10-Cecka JM: The UNOS Scientific Renal Transplant Registry- 2000. In Terasaki PI, Cecka JM: Clinical Transplants 2000.Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 2001.

11-United Network of Organ Sharing: 2000 Annual Report of The U.S Scientific Registry of Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplant Network, Washington , DC.

12- Comprehensive Clinical Nephrology, Chapter 92; Outcomes of Renal Trnasplantation.

13-Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK. Molecular biology of atherosclerosis.Int J Cardiol. 1997 Dec 31;62 Suppl 2:S23-9. Review.

14-Ross R. Atherosclerosis –an inflammatory disease. The New England Journal of Medicine. 1999;340:115-126

15- Wassmann S, Nickenig G.Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction--modulation by statins:Endothelium. 2003;10(1):23-33. Review

16-Libby P.Inflammation in atherosclerosis.Nature.2002;420:868-874

17- Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS.Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction.Front Biosci. 2004 May 1;9:1118-35. Review

18- Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F.Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles.Diabetes. 2002 Sep;51(9):2840-5.

19- Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS.Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. Hypertension. 2003 Feb;41(2):211-7.

20- Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS.High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes.Am Heart J. 2003 Jun;145(6):962-70.

21- Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction.Circulation. 2001 Nov 27;104(22):2649-52.

22- Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G.Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease.Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Jan;26(1):112-6. Epub 2005 Oct 20.

23- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.

Circ Res. 1999 Aug 6;85(3):221-8.

24- Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. Circ Res. 2000 Oct 27;87(9):728-30

25- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes.

N Engl J Med. 2005 Sep 8;353(10):999-1007

26- Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. Circulation. 2005 Jun 7;111(22):2981-7

27- Rössig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. Basic Res Cardiol. 2001 Feb;96(1):11-22. Review

28- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N Engl J Med. 2003 Feb 13;348(7):593-600

29- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.

Circ Res. 2001 Jul 6;89(1):E1-7.

- 30- Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002 Jun 25;105(25):3017
- 31- Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*. 2003 Jul 25;93(2):e17-24. 2003 Jun 26
- 32- Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2001 Jun 19;103(24):2885-90
- 33- Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):343-53. Review
- 34- Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3106-12.
- 35- Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci B. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;996:141-51
- 36- Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 1999 May;103(9):1231-6. Review

37- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia.

Circulation. 2001 Feb 6;103(5):634-7.

38- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med. 2001 Apr;7(4):430-6.

39- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. J Clin Invest. 2000 Jun;105(11):1527-36.

40- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T; Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial.

Lancet. 2002 Aug 10;360(9331):427-35

41- Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. J Am Coll Cardiol. 2004 Oct 19;44(8):1690-9

42- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA.

Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. N Engl J Med. 2000 Mar 2;342(9):626-33

- 43- Pillarisetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation*. 2001 Oct;25(5):293-300.
- 44- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001 Feb;88(2):167-74
- 45- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002 May 31;109(5):625-37.
- 46- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2776-9.
- 47- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Mische E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004 Jan 20;109(2):220-6. Epub 2003 Dec 22.
- 48- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefler DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*. 2000 Sep;6(9):1004-10. Erratum in: *Nat Med* 2001 Jan;7(1):129.

49- Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rössig L, Spyridopoulos I, Zeiher AM, Dimmeler S.HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes.Circ Res. 2003 May 16;92(9):1049-55. Epub 2003 Apr 3

50-Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis.Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos AK.J Exp Med. 2003 Jun 16;197(12):1755-65

51-Springer TA; Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.Cell. 1994 Jan 28;76(2):301-14. Review.

52-Muller WA; Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response.Lab Invest. 2002 May;82(5):521-33. Review.

53-Soligo D, Schiró R, Luksch R, Manara G, Quirici N, Parravicini C, Lambertenghi Delilieri G.Expression of integrins in human bone marrow.

Br J Haematol. 1990 Nov;76(3):323-32.

54-Lapidot T.Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions.

Ann N Y Acad Sci. 2001 Jun;938:83-95. Review.

55-Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL.Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines.

J Exp Med. 2002 May 6;195(9):1145-54.

56-Kimura T, Boehmler AM, Seitz G. Sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4478-86

57-Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003 Mar 11;107(9):1322-8

58-Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. 2000 Jun 23;86(12):1198-202

59-Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):439-42

60-Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP; Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):62-6

61- Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, Zhu JH, Xie XD, Sun J, Shang YP, Guo XG, Dai HM, Hu SJ. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Feb;36(2):233-9.

62-Suh W, Kim KL, Choi JH, Lee YS, Lee JY, Kim JM, Jang HS, Shin IS, Lee JS, Byun J, Jeon ES, Kim DK. C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 13;321(1):65-71

63-Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2058-67. Epub 2004 Apr 12.

64-Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003 Feb 13;348(7):593-600.

65-Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Sep;107(3):273-80

66-Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res*. 2004 Feb;27(2):101-8.

67-Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004 Jan;53(1):195-9

68-Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002 Nov 26;106(22):2781-6

69-Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer J, Fischer S, Gross P. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2005 Nov;183(1):163-7.

70-Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Apr;25(4):698-703

71- Kasiske BL, Chakkerla HA, Roel J. Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1735-1743

72-- Kasiske BL. Epidemiology of cardiovascular disease after renal transplantation. *Transplantation* 2001; 72:S5-S8

73- US Renal Data System. *USRDS 1998 annual report.* Bethesda: National institute of diabetes and digestive and kidney diseases, 1998

74- Abbott KC, Bucci JR, Cruess D. Graft loss and acute coronary syndromes after renal transplantation in the united states. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2560- 2569

75- Humar A, Gillingham K, Payne WD. Increased incidence of cardiovascular complications in kidney transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Transplantation* 2000; 70(2):310-313

76-Coronary artery calcification is related to coronary atherosclerosis in chronic renal disease patients: a study comparing EBCT-generated coronary artery calcium scores and coronary angiography. Haydar AA; Hujairi NM; Covic AA; Pereira D; Rubens M; Goldsmith DJ. *Nephrol Dial Transplant* 2004 Sep;19(9):2307-12

77- S.G. Miriuka, V. Rao, M. Peterson, L. Tumiaty, D. H. Delgado, R. Mohan, D. Ramzy, D. Stewart, H. J. Ross, T. K. Waddell mTOR Inhibition Induces Endothelial Progenitor Cell Death *AJT* 2006 6:2069-2079

78- Comprehensive Clinical Nephrology second edition. 2003 Toronto chapter 85 page 1062-1064

79- Hay N, Sonenberg N.Upstream and downstream of mTOR.

Genes Dev. 2004 Aug 15;18(16):1926-45. Review.

80- Fingar DC, Blenis J.Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression.

Oncogene. 2004 Apr 19;23(18):3151-71. Review

81-Sehgal SN.Immunosuppressive profile of rapamycine.Ann NY Acad Sci.

1993;696:1-8

82- Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppeler HA, Starling RC, Sørensen; RAD B253 Study Group.Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients.

N Engl J Med. 2003 Aug 28;349(9):847-58

83- Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnár F, Falotico R;

A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization.N Engl J Med. 2002 Jun 6;346(23):1773-80

84- Huang S, Houghton PJ.Targeting mTOR signaling for cancer therapy.

Curr Opin Pharmacol. 2003 Aug;3(4):371-7. Review

85- Miriuka SG, Rao V, Peterson M, Tumiati L, Delgado DH, Mohan R, Ramzy D, Stewart D, Ross HJ, Waddell TK.mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death.Am J Transplant. 2006 Sep;6(9):2069-79. Epub 2006 Jun 22

- 86- Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation*. 2005 May 3;111(17):2257-73. Review
- 87- Walter DH, Schachinger V, Elsner M, et al. Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am J Cardiol*. 2000; 85:962–968.
- 88- Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1995;332:481–487.
- 89- Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994;93:662–670.
- 90- Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone-marrow derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001;108:399–405.
- 91- Statin Therapy Accelerates Reendothelialization: A Novel Effect Involving Mobilization and Incorporation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells. Dirk H. Walter, Kilian Rittig, Ferdinand H. Bahlmann, Rudolf Kirchmair, Marcy Silver, Toshinori Murayama, Hiromi Nishimura, Douglas W. Losordo, Takayuk Asahara and Jeffrey M. Isner 2002;105;3017-3024; originally published online May 20, 2002; *Circulation*
- 92- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3974 –3978.

- 93- Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5978 –5982.
- 94- Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood*. 2004;103:921–926
- 95- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003;102:1340 –1346
- 96- Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem*. 1998 Jul;31(5):335-40. Review
- 97- Riesterer O, Zingg D, Hummerjohann J, Bodis S, Pruschy M.
Degradation of PKB/Akt protein by inhibition of the VEGF receptor/mTOR pathway in endothelial cells. *Oncogene*. 2004 Jun 3;23(26):4624-35.
- 98- Sugatani T, Hruska KA. Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *J Biol Chem*. 2005 Feb 4;280(5):3583-9. Epub 2004 Nov 15.
- 99- Desai BN, Myers BR, Schreiber SL. FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4319-24

100-Harada H, Andersen JS, Mann M: p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9666-70

101- Shinjyo T, Kuribara R, Inukai T; Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(3):854-64

102-Butzal M, Loges S, Schweizer M, Fischer U, Gehling UM, Hossfeld DK, Fiedler W. Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res*. 2004 Oct 15;300(1):65-71

103-Chev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):952-8.

104-Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 2000 Sep;70(3):829-34

105 - Chong ZZ, Kang JQ, Maise K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation*. 2002;106:2973–2979

106 - Santhanam AV, Smith LA, Akiyama M, Rosales AG, Bailey KR, Katusic ZS. Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke*. 2005;36:2731–2737.

107- Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, Ito Y, Ohta J, Tada H, et al. Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation*. 2006;113:1442–1450.

108- Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi Y, Matsuno K, Matsui A, et al. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res*. 2006;98:1405–1413

109- T E Peterson and Z S Katusic. EPO tecting the Endothelium. *Br J Pharmacol*. 2007 April; 150(7): 823–825

110- Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):921-6.

111- Bahlmann FH, DeGroot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, Haller H, Fliser D. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int*. 2003 Nov;64(5):1648-52.

112- Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi Y, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi K, Nomura T, Takahashi T, Tatsumi T, Matsubara H. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res*. 2006 Jun 9;98(11):1405-13. Epub 2006 Apr 27.

113- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998 Mar 31;97(12):1129-35.