

İskemi-Reperfüzyon Modelinde, Böbrek Korteksindeki Histopatolojik Değişiklikler ve Eritropoetin'in Koruyucu Etkisi

THE HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN THE KIDNEY KORTEK IN AN ISCHEMIA-REPERFUSION MODEL AND ERYTHROPOIETIN'S PROTECTIVE EFFECT

Bekir Uğur ERGÜR¹, H.Alper BAĞRIYANIK¹, Ülker SÖNMEZ¹, Ali Rıza ŞİŞMAN², Nükhet TUĞYAN³, Zişan BULDAN¹

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

³İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü

ÖZET

Amaç: Eritropoetin (Epo), böbrekten salgılanan glikoprotein yapıda ve hematopoetik sistemi üzerine etkili bir hormondur. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, Epo'nun santral sinir sistemi hücrelerini iskemik hasara karşı koruduğu bulunmuştur. Biz de araştırmamızda, böbrek dokusunda iskem-reperfüzyon (I/R) hasarının oluşturduğu histopatolojik değişiklikler ve Epo'nun koruyucu etkisini deneysel bir model üzerinde araştırdık.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada, 21 adet 200-250 g Wistar Albino suşu sıçan kullanıldı. Kullanılan sıcak iskem modelinde, 1 saat iskem, 30 dakika reperfüzyon uygulandı. I/R hasarına karşı koruyucu ajan olarak reperfüzyon öncesi intraperitoneal (i.p.) 25 IU/kg ve 100 IU/kg Epo kullanıldı. İskemi sonrası böbreklerdeki histopatolojik değişiklikler ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Bulgular: Elde edilen kesitlerin mikroskopik incelemesinde, Epo 100 IU/kg verilen grupta, interstiyel eritrosit ekstrasvazyonunun, proksimal tubul hücrelerinde vakuolizasyonun, mononükleer hücre infiltrasyonunun en aza indiği gözlemlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda Epo'nun doza bağlı olarak böbrek I/R hasarını önlediğini gördük. Koruyucu ajan olarak Epo'nun, oluşan böbrek hasarına karşı yeni bir sağaltım yöntemi olabileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar sözcükler: Böbrek, iskem-reperfüzyon, hasar, eritropoetin

SUMMARY

Objective: Erythropoietin (Epo) is a glycoprotein influence on the hematopoietic system and is secreted from kidney. In the recent studies, the protective effect of Epo on central nerve system cells against ischemia-reperfusion (I/R) injury was found. We aimed to observe the histopathological changes in I/R injury in the kidney and the protective role of Epo in an experimental model.

Material and method: In this study, 21 male 200-250 gr Wistar rats were used, 1 hour ischemia and 30 minutes reperfusion was maintained in the model used. Epo was given 25 IU/kg and 100 IU/kg intraperitoneally as a protective agent against I/R injury. The kidney tissue specimens were examined and scored under light microscope.

Results: In Epo 100 IU/kg group, mononuclear cell infiltrations, vacuolations in proximal tubules and interstitial erythrocyte extravasations were significantly decreased.

Bekir Uğur ERGÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji-Embriyoloji AD

35320 Inciraltı İZMİR

Tel: (0) 232 2595959/ 4556

e-mail: bekir.ergur@deu.edu.tr

Conclusion: We observe with these findings that Epo protects kidney from I/R injury according to its dose. We think, Epo might be a new protective agent against I/R injury

Key words: Kidney, ischemia-reperfusion, erythropoietin

Dokuların kan akımı kesildiğinde canlılıklarını koruyabilecekleri belirli bir zaman dilimi vardır. İskemik hastalıklar sonrası oluşan hücresel hasara reperfüzyon zedelenmesi de eklendiğinde, hücresel ölüme dek giden karmaşık ve birbirine ilintili reaksiyon zincirleri oluşur (1-3). Reperfüzyon sonrası oluşan hasardan genelde serbest oksijen radikalleri ve nötrofiller sorumlu tutulmaktadır (3-6). Renal İ/R hasarının azaltılması için pek çok farmakolojik ajan kullanılmıştır. Çeşitli araştırmalarda, Epo kullanılarak farklı dokulardaki İ/R hasarı en aza indirilmiştir (7-10). Ancak, böbrek ile ilgili bir çalışmanın olmaması ve Epo'nun böbrek dokusuna İ/R sonrası etkisinin ne olacağı sorusuna yanıt bulabileceğimizi düşünerek çalışmamızı planladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nden sağlanan 21 adet 200-250 g Wistar Albino suşu erkek sıçanlar kullanıldı (Bu araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir). Bu denekler, herbiri 7 sıçandan oluşan üç gruba ayrılmıştır (kontrol, Epo 25, Epo 100). Deneklerin anestezileri i.p. 40 mg/kg pentobarbital ile yapıldı (4,11,12). Median laparotomi sonrası tüm gruplarda sağ böbrek arter ve veni görünür hale getirildi. Sonra, tüm gruplarda sağ nefrektomi yapılarak alınan kan örnekleri ve sağ böbrekler bu deneyin "sham" değerleri olarak kabul edildi. Daha sonra, sol böbrek arteri atravmatik vasküler klempe ile 60 dakika klempe edilerek böbreğe sıcak iskemik uygulandı ve daha sonra 30 dakika reperfüze edildi (2,13,14). Reperfüzyon ile eş zamanlı deney gruplarına 25 IU/kg ve 100 IU/kg dozlarında Epo i.p. olarak verildi (8). Reperfüzyon sonrası sol böbrek veninden kan örnekleri alındı. Bu sırada v. cava inferior'dan kan geri akımını önlemek için böbrek veni askıya alındı. Cerrahi işlem öncesi ve sonrası alınan kan örneklerinde BUN ve Kreatinin değerlerine bakıldı. Alınan kan örneklerinin biyokimyasal verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi, Mann-Whitney U Testi ile

yapıldı. İ/R kontrol grubuna, i.p. 25 IU/kg Epo verilen gruba ve i.p.100 IU/kg Epo verilen gruba sol nefrektomi uygulandı. Çalışma sonunda deneklere yüksek doz i.p. 100 mg/kg pentobarbital verilerek sakrifiye edildi. Alınan böbrek dokuları %10'luk tıbbi formaldehit solusyonunda fiksle edildi ve parafine gömüldü. Çalışma sırasında böbrek dokusu değerlendirilirken, korteks bölümü dikkate alındı. Böbrek dokusuna ait kesitler Hematoksilen-Eozin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (11,13,15,16). Kontrol ve deney gruplarından elde edilen kesitlerde Kelly ve ark(16)'nın kullandığı mikroskopik skorlama uygulandı. Eritrosit ekstravazasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu ve tüp epitelinde vakuolizasyona bakılarak elde edilen verilerin istatistiksel analizinde üç gruba birlikte karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi kullanıldı (5). Grupları ikili olarak karşılaştırmak için Mann-Whitney U Testi kullanıldı (5).

BULGULAR

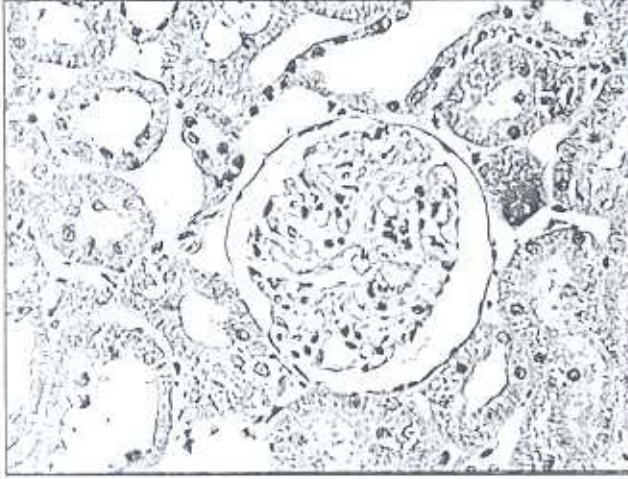
İ/R modelinde sıçanlarda böbrek dokusunun histopatolojik olarak incelenmesiyle deney grupları arasında farklı mikroskopik görünümeler ortaya çıktı.

İ/R kontrol grubu; Sağ ve sol böbrekler karşılaştırıldığında böbreklerde intertisyumda konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu ve tüp epitelinde vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 1-3). Proksimal tubulusların yapılarına bakıldığında bazal membranlarında düzensizlik, fırçamsı kenarlarında yer yer dökülmeler, proksimal tubul epitelinde atrofik hyalin materyal içeren yapılar görüldü. Intertisyel alanda artmış eritrosit ekstravazasyonu dikkati çekti (Şekil 2). Dört denekte yoğun tüp epitelinde vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 4).

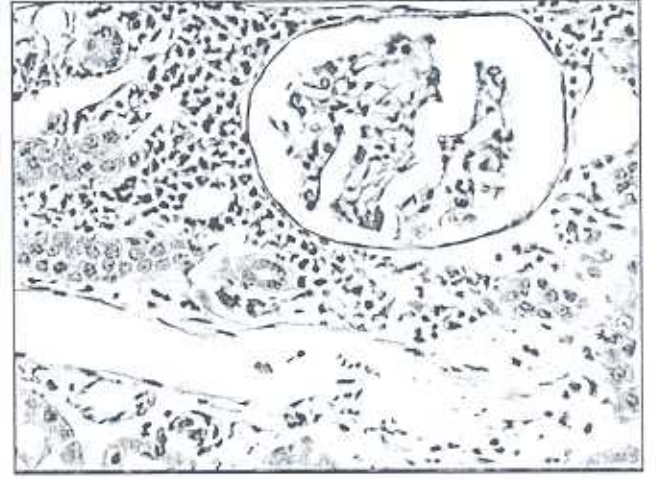
Epo 25 IU/kg grubu; Kortekste bulunan glomerüllerin kontrol grubuna göre daha iyi durumda oldukları gözlemlendi. Glomerüllerin incelenmesinde pariyetal ve visseral yapıların bozulmadığı, glomerül etrafında bulunan mononükleer hücre infiltrasyonunun

azaldığı görüldü. Kontrol grubunda, glomerüllerin içinde atılmış olarak görülen eritrosit kümelerinin oldukça azaldığı gözlemlendi. Kortekste görülen interstisyel eritrosit ekstrevasiyonunun daha az olduğu, mononükleer hücre infiltrasyonunun damar duvarı ve pelvis renalis çevresinde hala bulunduğu görüldü (Şekil 5,6).

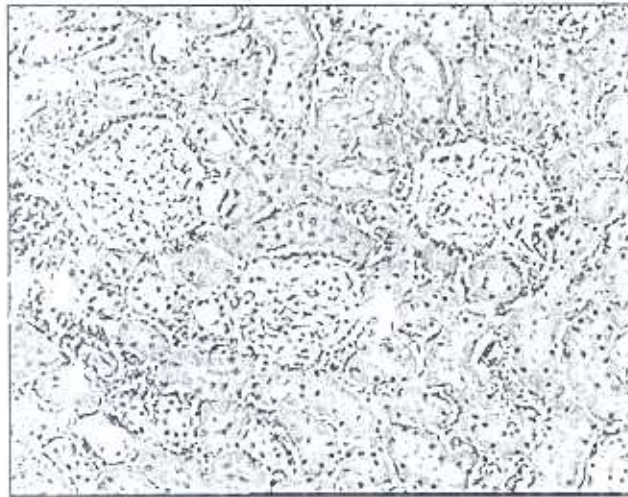
Mononükleer hücre infiltrasyonunun yanında iki örnekte eozinofilik infiltrasyon bulundu. Tüp epitelinde vakuolizasyona kortekste sıkça rastlandı (Şekil 7). Tubuluslar incelendiğinde bazal membranlarında düzensizliklerin kaybolduğu, tubul lümeninde biriken eritrositlerin azaldığı görüldü.



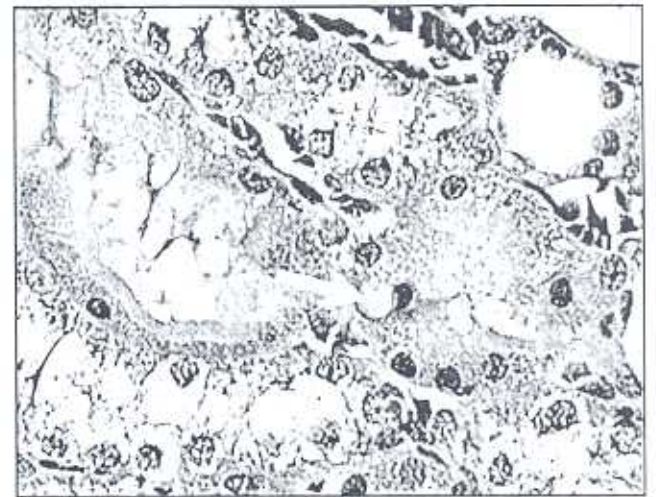
Şekil 1. Sham grubu sağ böbrek, korteks genel görünümü H+E X 66



Şekil 3. I/R kontrol grubu korteks genel görünümü, interstiyumda ml hücre infiltrasyonu H+E X 66



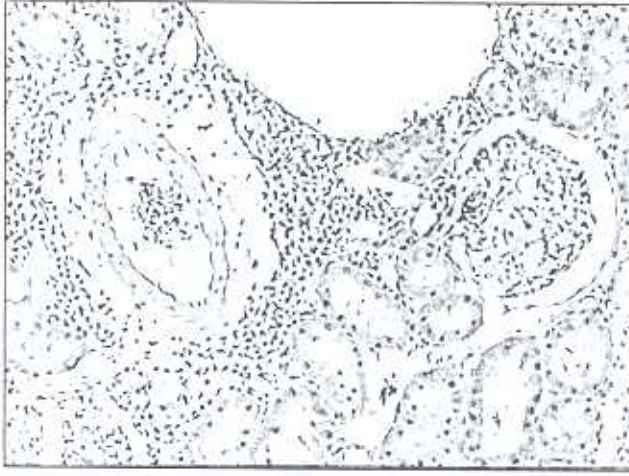
Resim 2. I/R kontrol grubu korteks genel görünümü, eritrosit ekstrevasiyonu H+E X 66



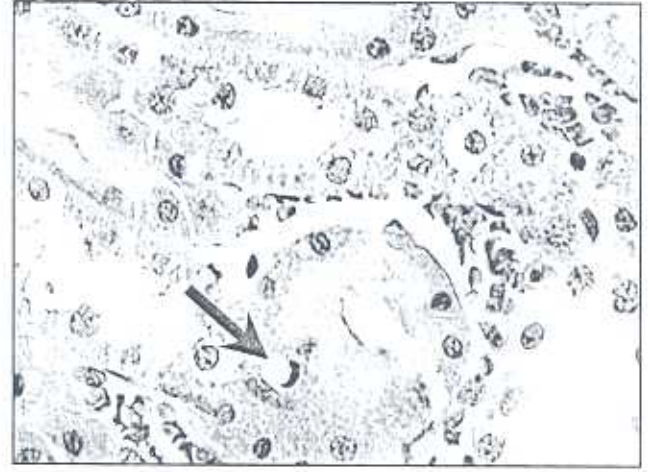
Şekil 4. I/R kontrol grubu tüp epitel hücrelerinde vakuolizasyon H+E X132

Epo 100 IU/kg grubu: Kortekste diğer gruplarda gözlenen bulguların tamamına yakın kısmının düzeldiği görüldü (Şekil 8). Diğer gruplarda gözlenen interstisyel eritrosit ekstravazasyonunun bir denek dışında kaybolduğu gözlemlendi. Mononükleer hücre infiltrasyonuna bu grupta sadece bir tane örnekte çok az miktarda rastlandı. Tüp epitelinde vakuolizasyon

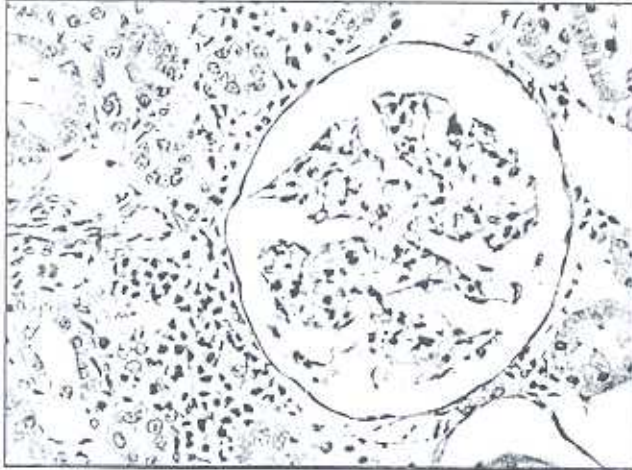
değerlendirildiğinde, ender sitoplazmik vakuolizasyonlar iki denekte görüldü. Kortekste glomerüller ve Bowman kapsülünün visseral ve pariyetal yaprakları düzenliydi ve herhangi bir hasar yoktu. Tubullerin gerek bazal membranları, gerekse epitellerinde herhangi bir patolojik duruma rastlanmadı (Şekil 8).



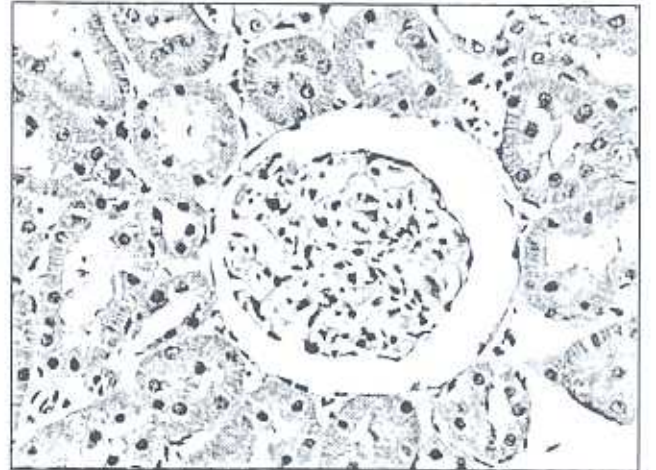
Şekil 5. Epo- 25 grubu korteksin genel görünümü, damar duvarı çevresinde ml hücre infiltrasyonu H+E X 66



Şekil 7. Epo- 25 grubu tüp epitel hücresinde vakuolizasyon H+E X 132



Şekil 6. Epo- 25 grubu korteksin genel görünümü, interstisyumda ml hücre infiltrasyonu H.E+ X 66



Şekil 8. Epo-100 grubu korteks, glomerül ve tubuluslar H+E X 66

Alınan kan örneklerinin biyokimyasal verilerinin Mann-Whitney U Testi ile yapılan istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda; her iki biyokimyasal parametrenin üç grupta da anlamlı olarak birbirinden farklı olduğu gözlemlendi. BUN değerlerinin, Epo'nun deneklere verilmesi ile kan seviyesinin kontrol grubuna göre düşük değerlere ulaştığı

saptandı (Tablo I). Kreatinin değerlerine bakıldığında, kan seviyesinin Epo'nun dozuyla ilişkili olarak azaldığı, Grup II ve Grup III arasında önemli farkın olmadığı saptandı (Tablo I,II).

Tablo I. BUN, Kreatinin değerleri

Denek No	Kontrol	BUN		Kreatinin		
		Epo-25	Epo-100	Kontrol	Epo-25	Epo-100
1	54,8	26,1	21,3	1,4	1,1	1,0
2	40,7	31,7	23,9	1,4	1,0	0,9
3	56,3	25,9	17,6	1,5	1,1	1,0
4	44,6	28,7	17,8	1,3	1,0	0,8
5	38,9	29,5	23,9	1,1	0,9	0,9
6	47,3	29,7	21,8	1,4	1,0	1,1
7	33,8	29,3	22,6	1,1	1,0	1,0

Tablo II. Biyokimyasal değerlerin Mann-Whitney U Testi ile değerlendirilmesi

"p"değeri	Grup I-II	Grup I-III	Grup II-III
BUN	0,002	0,002	0,002
Kreatinin	0,005	0,004	0,241

Histopatolojik olarak görünümlerin skorlanmasıyla elde edilen sonuçlar tablo şekline getirildiğinde anlamlı bulgularla karşılaşıldı (Tablo III).

Tablo III. Mikroskopik skorlama verilerinin Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmesi

Gruplar	I/R Kontrol Grubu	Epo-25 Grubu	Epo-100 Grubu
$P < 0,001$	0,000	0,000	0,000

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kontrol grubu ile Epo verilen gruplar arasında histopatolojik olarak önemli farkların olduğu, Epo'nun dozuna bağlı olarak böbrek dokusunda oluşan zedelemde azalma olduğu görüldü (Tablo IV).

Tablo IV. Mikroskopik skorlama verilerinin Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmesi

Parametreler	I-II. Grup "P" Değeri	I-III. Grup "P" Değeri	II-III. Grup "P" Değeri
Entrosit ekstravazasyonu	0,004	0,001	0,001
Mononükleer hücre infiltrasyonu	0,165	0,001	0,001
Tup epitelinde vakuolizasyon	0,053	0,001	0,001

TARTIŞMA

Böbrekler, organizmadaki diğer organlar gibi birçok klinik durumlarda iskemik olaylarla karşı karşıya kalırlar. Şok ve renal transplantasyon böbreğin en sık iskemik ve reperfüzyon ile karşı karşıya kaldığı klinik durumlardır. Renal iskemik, böbrek tübül hücrelerinin hücrel metabolik aktivitelerini bozarak etki gösterir. İskemiden sonra kan akımının tekrar geri sağlanması sonucunda daha ileri hasar, sıklıkla lipid peroksidasyonu ve oluşan serbest oksijen radikalleri ile meydana gelir. Bu nedenle, reperfüzyon her zaman dokulara yarar sağlamaz. İskemiyeye bağlı olarak β oksidasyonu yavaşlar, bu da mitokondrinin metaboliz-

masının azalmasına yol açar. Mitokondrideki metabolizmanın yavaşlaması, esas hücrelerin bütünlüğünü sağlayan enerji üretiminde gerilemeye ve hücre hasarına neden olur. Bizim uyguladığımız 60 dk'lık iskemik klinikte özellikle böbrek transplantasyonlarında renal arterin klempe edilip anastomozların tamamlanması sırasında geçen zaman dilimini gösteren gerçekçi bir zaman atalığıdır. Renal iskemik, akut böbrek yetmezliğinin en önemli etkenlerinden birisidir. Proksimal tubulus hücreleri böbreğin iskemiden en çok etkilenen bölümüdür (1,3,4). İskemi ve reperfüzyona bağlı böbrek hasarını açıklamaya çalışan pek çok araştırma yapılmıştır. Oluşan hasarı en aza indirmek için bir çok ajan kullanılmıştır (2,15-18).

Çalışmamızda seçilen eritropoetin dozlari, diğer Epo ile yapılan çalışmalarda kullanılan ve iskemik hasara karşı hücrelerin korunduğu dozlardır. Garcia-Criado FJ ve ark (19) Molsidomine'i reperfüzyon öncesi sistemik şekilde kullanarak böbrek yapı ve fonksiyonlarının korunduğunu bulmuşlardır. Roheden EL ve ark (4) L-argininin'in postiskemik böbreklerde reaktif oksijen türleri ile oluşan hasarı azalttığını ve böbrek fonksiyonlarının korunduğunu izlemişlerdir. Ergün O ve ark (2) deneysel iskemik reperfüzyon modelinde karnitin'i kullanmışlar ve böbreğin hasardan korunduğunu gözlemişlerdir. Özen S ve ark (12) ise aminogüadin'i kullanarak böbreğe etkilerini incelemişlerdir. Daniel AS ve ark (13) böbrek dokusunun korunması için L-argininin ile birlikte kortikosteroid'lerin kullanılmasının uygun olabileceğini belirtmişlerdir. Kelly KJ ve ark (16) iskemik akut böbrek yetmezliğinde kullandıkları alfa-MSH'nin lökosit infiltrasyonunu ve yangısal sitokinlerin salınımını azaltarak tubuler hücre apoptozunu önlediğini gözlemişlerdir. Hsu C ve ark (20) ise çalışmalarında, alfa-MSH'nin lökosit bağımlı olaylar zincirini inhibe ederek İ/R incinmesini azalttığını bulmuşlardır.

Epo'nun etkilerinin araştırıldığı sistemlerden biri de, santral sinir sistemidir. Epo'nun nöroprotektif etkisinin olduğu bildirilmiştir. Chin K ve ark (9) Epo'nun sinir hücrelerindeki intertüsyel kalsiyum düzenlenmesinde etkili olduğunu, apoptozu önlediğini bulmuşlardır. Epo'nun iskemik-reperfüzyon hasarındaki

koruyucu etkisinin altında yatan mekanizmalar ve bu mekanizmaların işleyişi hala tam olarak kanıtlanmamış hipotez aşamasındadır. Ancak, santral sinir sistemindeki yapılan deneysel çalışmalarda Epo'nun ortaya çıkan yüksek NO miktarını glutamat reseptör antagonisti olarak azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, doku perfüzyonunun iyileşmesini ve mikrovasküler permeabilitenin artışı engelleyici de savunulmaktadır. Masahiro S ve ark (21) çalışmalarında Epo'nun süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan enzimleri aktive ederek bu yolla iskemik hasarı önlediğini izlemişlerdir. Anagnostou ve ark (22) Epo'nun embriyonik endotelial hücrelerin aktivasyonunu ve gelişimini uyardığını bulmuşlardır.

Son yıllarda epitelial hücrelerin muhtemelen endotelial hücrelerin aktivasyonunun, IL-1, IL-6, IL-8, Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1), Tümör nekroz faktörü - α (TNF- α) gibi kemokinlerin ve sitokinlerin açığa çıkması ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu kemokinler ve sitokinler de inflamatuvar döngünün başlaması için önemli rol oynarlar. Başlangıçtaki iskemik dönemini takip eden hipoksinin uzaması ve inflamatuvar cevabın artması ile doku hasarı artmaya başlar. Gelişen bu olaylar en çok böbreğin kortikomeduller bileşke yerinde gözlenir. Bu dönemde, staz, kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin kümelenmesi gözlenir. Ayrıca, renal vasküler endotelial hasar, renal tubuler epitelin iskemisinin oluşumunda ve inflamatuvar cevapta anahtar rol oynar. Araştırmamız sırasında gözlediğimiz mononükleer hücre infiltrasyonu, intertüsyel eritrosit ekstrasvazasyonu bu etkenlere bağlı olabilir ve bunların şiddeti iskemik-reperfüzyon hasarı ile paraleldir.

Görüldüğü gibi, Epo'nun iskemik-reperfüzyon sonrası farklı dokularda kullanımı ve oluşan hasardaki koruyuculuğuyla ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Buna karşın Epo'nun asıl salgılandığı yer olan böbrekteki İ/R hasarına yönelik koruyucu etkisinin olup olmadığı şimdiye kadar araştırılmamıştır. Biz çalışmamızda, Epo'nun doza bağlı olarak böbrek dokusunda iskemik-reperfüzyon hasarını önlediğini gördük. Varolan bulgularımızı destekleyecek ileri çalışmaların ve tam olarak açıklanamayan Epo'nun etki mekanizmalarının araştı-

rilmasıyla, bu farmakolojik ajanın kullanılabilirliği alanlara bir yenisinin eklenebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647.
2. İrgün O, Ulman C, Kılıçalp AS. Carnitine as a agent in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *Urol Res* 2001;29:186-189.
3. Joel MW. The cell biology of ischemic renal injury. *Kid Int* 1991;39:476-500.
4. Rhoden EL, Luitz PL, Claudio RR et al. Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in renal ischemia-reperfusion in rats. *Eur J Surg* 2001;167:224-228.
5. Weight SC, Furness PN, Nicholson ML. Biphasic role for nitric oxide in experimental warm ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1999;86:1039-1046.
6. Francis BG. Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:10-15.
7. Pandit JJ, Maxwell PH. New insights into the regulation of erythropoietin production. *Br J Anaesthesia* 2000;85:329-330.
8. Calapat G, Marciano MC, Corica F et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharm* 2000; 401:349-356.
9. Chin K, Yu X, Beslesin-Cokic B, et al. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Molecular Brain Research* 2000;81:29-42.
10. Eckardt KU. After 15 years of success-perspectives of erythropoietin therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1745-1749.
11. Gustavo M, Luis HT, Stuart B et al. Nitric oxide diminishes apoptosis and p53 gene expression after renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant* 2000;70:1431-1437.
12. Özen S, Usta Y, Sabin I et al. Association of nitric oxide production and apoptosis in a model of experimental nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:32-38.
13. Daniel AS, Yining X, Nestor F et al. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 1997;63:495-500.
14. Tan Chorh C, Tan Lay H, Eckardt K. Erythropoietin production in rats with post-ischemic acute renal failure. *Kid Int* 1996;50:1958-1964.
15. Sang KJ, Su YY, Kyung HC et al. Alfa-msh decreases apoptosis in ischemic acute renal failure in rats; possible mechanism of this beneficial effect. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1583-1591.
16. Kelly KJ, Nancy R, Green AL. Induction of stress response proteins and experimental renal ischemia/reperfusion. *Kid Int* 2001; 59:1798-1802.
17. Koji H, Kenji O, Yuji T et al. Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *Ann Surg* 2000;232: 272-280.
18. Michael Ross. *Histology, A text and Atlas*. 3rd Edition Oxford Publications 1995;558-567.
19. Garcia-Crudo FJ, Eleno N, Santos-Benito F et al. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplant* 1998;66:982-990.
20. Hsi C, Yukimasa K, Leonard C. Alfa-melanocyte stimulating hormone inhibits renal injury in the absence of neutrophils. *Kid Int* 1998;54:765-774.
21. Masahiro S, Tong-Chun W. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:4635-4640.
22. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:3974-3978.