

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

Summary

Kristina M. Renault, Ditte C. Brander,
Else Hove Kristensen, Merete Christensen &
Henrik Ovesen:

**Does flouroscopy increase the rate of success
in performing colonoscopy?**

A prospective randomised study.

Ugeskr Læger 2003;165:2473-7.

Introduction: No randomised trials have estimated the value of using fluoroscopy for colonoscopy. The aim of our study was to estimate the rate of success using this method.

Material and methods: In a prospective trial 264 patients were included, 139 were examined without fluoroscopy-equipment (Group A), and 125 with fluoroscopy-equipment (Group B). We registered: Indication for colonoscopy, duration of the colonoscopy, medication, time in which X-ray was being used, whether caecum was reached or not, clinical results of the examinations and complications. In cases where caecum was not intubated the cause was registered.

Results: We found a significantly higher rate of success of the colonoscopy in Group B (84%) than in group A (74%) ($p = 0.045$). Pain and looping of the scope were the main reasons for insufficient examination.

Discussion: In a modern endoscopic ward fluoroscopy must be available, but it seems reasonable to start uncomplicated

colonoscopies without the use of fluoroscopy. In cases where caecal intubation is not obtained, conversion to examination with fluoroscopy should be possible.

Reprints: *Kristina M. Renault*, Fodbygårdsvej 4, DK-4700 Næstved.
E-mail: krta@dadlnet.dk

Antaget den 28. marts 2003.
Centralsygehuset i Næstved, Parenkymkirurgisk Afdeling.

Litteratur

1. Statens Institut for Medicinsk Teknologivurdering. Kræft i tyktarm og endetarm. København: Sundhedsstyrelsen, 2001.
2. Cirocco WC, Rusin LC. Documenting the use of fluoroscopy during colonoscopic examination: a prospective study. *Surg Endosc* 1991;5:200-3.
3. Cirocco WC, Rusin LC. Fluoroscopy. *Surg Endosc* 1996;10:1080-4.
4. Anderson ML, Heigh RI, McCoy GA et al. Accuracy of assessment of the extent of examination by experienced colonoscopists. *Gastrointest Endosc* 1992;38:560-3.
5. Cirocco WC, Rusin LC. Confirmation of cecal intubation during colonoscopy. *Dis Colon Rectum* 1995;38:402-6.
6. Schlapfer HU. Colonoscopy without the aid of fluoroscopy. *Schweiz Med Wochenschr* 1993;123:1563-5.
7. Waye JD. Colonoscopy without fluoroscopy. *Gastrointest Endosc* 1990;36:72-3.
8. Achaim M, Rosenberg J. Kvalitet af koloskopi og kirurgisk behandling af perforationer. *Ugeskr Læger* 2001;163:775-8.
9. Adam IJ, Ali Z, Schothouse AJ. Inadequacy of colonoscopy revealed by three-dimensional electromagnetic imaging. *Dis Colon Rectum* 2001;44:978-83.
10. Rogers BH. Colonoscopy with fluoroscopy. *Gastrointest Endosc* 1990;36:71-2.
11. DRG's: Diagnosis Related Groups: Definitions Manual. Seventh Revised edition. New Haven, Connecticut: Health Systems International, 1994:1-1062.

Erythropoietin – en ny terapi ved cerebral iskæmi?

Louise Vennegaard Kallialis & Niels Vidiendal Olsen

Resumé

Renalt dannet erythropoietin (EPO) er kendt som en vigtig hæmatopoietisk faktor, og den rekombinante humane form anvendes i dag med stor succes i behandlingen af anæmiske tilstande. EPO og dets receptor findes også i gliaceller, neuroner og cerebrovasculært endotel, og ekspresionen i CNS opreguleres under iskæmi eller hypoksi. Ny forskning har vist, at intratekal administration af EPO har en markant antiinflammatorisk og neuroprotektiv virkning ved akut cerebralt insult hos gnave. Virkningsmekanismen omfatter en opregulering af specifikke apoptosehæmmende og antioxidative signalveje. Desuden kan neurotrofiske og angiogene virkninger af EPO bidrage til en længerevarende protektion. Også systemisk administreret EPO reducerer neuronskaden efter cerebral iskæmi og forhindrer desuden tabet af autoregulationen af hjernens gennemblødning efter eksperimentel subaraknoidalblødning. Rekombinant humant EPO er et sikkert og atoksisk lægemiddel, og de nye opdagelser varsler et væld af potentielle terapeutiske muligheder.

EPO er et cytokinhormon, der hovedsageligt dannes i nyrerne og leveren, og som længe har været kendt for sin centrale rolle i erythropoiesen. Den rekombinante humane form af EPO (rHuEPO) blev introduceret som lægemiddel i 1989 og er siden blevet anvendt med stor succes til behandling af anæmi ved eksempelvis kronisk nyreinsufficiens eller cancer. Kliniske erfaringer har vist, at rHuEPO er et sikkert, atoksisk lægemiddel med få bivirkninger. Ny forskning har overraskende vist, at EPO, uafhængigt af den erythropoietiske virkning, har betydelige antiinflammatoriske og neuroprotektive virkninger, som måske vil kunne anvendes i behandlingen af akut cerebral skade.

EPO og dets receptor udtrykkes i CNS

EPO-mRNA er blevet påvist i hjernevæv hos både mus, rotter, aber og mennesker [1-4]. Produktionen varetages her primært af astrocytter [3], men også neuroner producerer

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

Tabel 1. Neuroprotektion af erythropoietin (EPO) i dyreeksperimentelle modeller.

Model	Reference
Fokal eller global iskæmi	<i>Sadamoto et al</i> (17) <i>Sakanaka et al</i> (18) <i>Bernaudin et al</i> (5) <i>Calapai et al</i> (20) <i>Brines et al</i> (11) <i>Sirén et al</i> (19)
Hovedtraume	<i>Brines et al</i> (11)
Autoimmun encephalitis	<i>Brines et al</i> (11)
Epilepsi (kainatinducerede kramper)	<i>Brines et al</i> (11)
Subaraknoidalblødning	<i>Alafaci et al</i> (21) <i>Buemi et al</i> (22) <i>Springborg et al</i> (23)
Iskæmisk rygmarvsskade	<i>Celik et al</i> (24)

EPO [4-6]. Cerebralt EPO er mindre end cirkulerende EPO (33 kDa vs. 35 kDa), på grund af en ringere grad af glykosylering [7].

Hos mus findes bindingssteder for EPO i blandt andet hippocampus og neocortex [2], to områder som er særligt vulnerable for hypoksi [8]. Siden er der påvist EPO-receptorer (EPO-R) i tilsvarende områder af menneskehjernen [3]. Ved hjælp af RT-PCR, in situ-hybridisering og immunhistokemi er der fundet EPO-R-mRNA og funktionelt protein i neuroner fra hippocampus og cortex [4, 5, 9, 10]. EPO-R udtrykkes desuden af endotelceller, astrocytter og mikroglia/makrofager [4, 5, 11, 12]. EPO-R tilhører cytokinreceptor type-1 superfamilien. Ved EPO's binding til EPO-R aktiveres den cytoplasmatiske tilknyttede tyrosinkinase *Janus tyrosine kinase 2* (JAK-2). Herved fosforyleres transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription-5* (STAT-5), som kan regulere gentranskriptionen af signalvejens bioaktive produkter [13]. Receptorer på erythrocytforstadier, kar- endotel og celler med neuronale egenskaber udviser forskelle i receptorantal og affinitet [9], men hvorvidt dette har betydning for EPO's celledspecifikke virkninger er endnu ikke afklaret, og der foreligger endnu ingen resultater vedrørende tætheden eller affiniteten af EPO-R på neuroner hos mennesker.

Forsøg med rotter har vist, at ekspressionen af EPO-mRNA i hjernen kunne induceres akut af hypoksi [1], og astrocytter fra rotter kan øge produktionen med en faktor 100 under hypoksi [7]. I humane neuroncellekulturer medfører hypoksi en øget ekspression af EPO-R [14]. Hos patienter med trau-

matisk hjerneskade [15] og hos neonatale patienter med asfyksi og intraventrikulærblødninger er der fundet forhøjede koncentrationer af EPO i cerebrospinalvæsken. Post mortem er der hos patienter med cerebralt infarkt eller hypoksisk hjerneskade fundet en markant opregulering af EPO og EPO-R i cerebrovaskulært endotel, neuronale celler og reaktive astrocytter [16]. Hos gnavere opreguleredes mRNA- og proteinekspressionen af EPO-R i neuroner i penumbrazonen efter fokal cerebral iskæmi [5, 17]. Den neuroprotektive betydning af denne bemærkelsesværdige mekanisme er blevet understreget af in vivo-forsøg, som viste, at neutralisering af hjernens endogene EPO med opløselige EPO-R forværede neuronskaden i hippocampus efter et iskæmisk insult og nedsatte indlæringsevnen hos forsøgsdyrene [18]. Ekspressionen af EPO reguleres af *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1), som også inducerer dannelse af bl.a. glykolytiske enzymer, der samlet set fremmer organismens adaptation til et hypoksisk eller oksidativt insult. Som fremført af *Siren et al* [19] hænger det teleologisk godt sammen: Øget renal produktion af EPO, og dermed øget iltbindingskapacitet, repræsenterer organismens adækvate respons på hypoksi, mens øget cerebral produktion af EPO beskytter neuronerne, de mest sårbare celler for hypoksi.

rHuEPO virker neuroprotektivt in vivo

Opdagelsen af et endogent, neuroprotektivt EPO/EPO-R-system har naturligt ledt til spørgsmålet om, hvorvidt en farmakologisk stimulation af systemet vil have en gunstig virkning ved cerebral iskæmi. Flere uafhængige publikationer viser, at rHuEPO har en markant neuroprotektiv virkning i forskellige dyreeksperimentelle modeller af akut cerebral skade (Tabel 1). I en model af global cerebral iskæmi hos ørkenrotter reducerede intratekal infusion af rHuEPO celledskaden i CA1-regionen i hippocampus [18] og formindskede tabet af indlæringsevne hos dyrene. Intratekal infusion af rHuEPO reducerede det kortikale infarktvolumen, orienteringsbesvær og sekundær talamisk degeneration efter fokal cerebral iskæmi [5, 17].

Det har overraskende vist sig, at rHuEPO ikke nødvendigvis skal administreres intratekalt for at virke neuroprotektivt. Efter kortvarig global iskæmi hos ørkenrotter sås sammenlignelige virkninger af intratekal og intraperitoneal administration på overlevelse, neurontab i hippocampus og graden af oxidativ skade i CNS [20]. Intraperitoneal administration af rHuEPO op til seks timer efter et fokalt iskæmisk insult medførte en reduktion i infarktvolumen på mellem 50% og 75% [11], og i overensstemmelse hermed et næsten totalt fravær af apoptotiske neuroner i penumbrazonen [19]. I dyreeksperimentelle studier af subaraknoidalblødning (SAH) medførte intraperitoneale injektioner af rHuEPO en forbedring i overlevelsesprocenten og den funktionelle restitution [22] samt en markant reduktion i antallet af nekrotiske neuroner i cortex [21]. For nylig vistes, at en enkel subkutan behandling med

Erythropoietin og dets receptor udtrykkes i hjernen og spiller en neuroprotektiv rolle ved iskæmiske eller hypoksiske tilstande.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

rHuEPO, der blev givet umiddelbart efter eksperimentelt induceret SAH, hos rotter normaliserede autoregulationen af hjernens gennemblødning [23].

EPO's neuroprotektive virkningsmekanismer

I knoglemarven stimulerer EPO erytrocytforstadiernes proliferation og differentiering, bl.a. ved hæmning af programmeret celledød, apoptose [19]. EPO virker også antiapoptotisk i neuronale celler [4, 19], og meget tyder på, at dette også er tilfældet *in vivo* [19]. Den intracellulære signaltransduktion med aktivering af JAK-2 og STAT-5, som er karakteristisk for virkningen af EPO i hæmatopoietisk væv, er også funktionel i neuroner [19]. Signaltransduktionen omfatter en aktivering af *mitogen activated protein kinase* (MAPK) og fosfatidylinositol-3-fosfatkinase [19], en signalvej som også benyttes af andre endogene, neuroprotektive substanser, som f.eks. *brain derived neurotrophic factor*. Nye forsøg tyder på, at EPO's hæmning af NO-induceret apoptose i kortikale neuroner fra rotter omfatter en aktivering af transskriptionsfaktoren *nuclear factor* (NF)- κ B [25]. Den EPO-medierede aktivering af NF- κ B er specifik for neuroner og sker muligvis via *cross-talk* fra JAK-2, som man hidtil har antaget kun aktiverede STAT-familien [25]. En vedholdt opregulering af NF- κ B vides at øge trans-

skriptionen af visse apoptosehæmmende proteiner, som blokerer aktiveringen af specifikke proteaser og opregulerer ekspresionen af antioxidative enzymer [26].

Neural celledød pga. apoptose eller nekrose er resultatet af en kompliceret proces, der omfatter en række intracellulære ændringer i blandt andet pH, ATP- og elektrolytkoncentrationen samt en øget produktion af de cytotoxiske, reaktive ilt radikaler NO, superoxid og peroxynitrit [8]. Aktivering af EPO-R-relaterede signalveje igangsætter tilsyneladende flere potentielt neuroprotektive og antiinflammatoriske mekanismer, som på forskellige niveauer kan hæmme det neuroinflammatoriske respons og efterfølgende apoptose (Fig. 1). Hypoksi/iskæmi fører i CNS til øget frigørelse af den excitatoriske aminosyre glutamat, som via en øget dannelse af NO spiller en afgørende rolle for udviklingen af apoptose [8]. Forbehandling med rHuEPO beskyttede hippocampale og kortikale neuroner mod glutamatinduceret celledød på en dosisafhængig måde [10] og medførte en markant reduktion i celledød forårsaget af NMDA (en glutamatreceptoragonist) i en blandet kultur af neuroner og astrocytter fra musens neocortex [5]. EPO hæmmer desuden produktionen og aktiviteten af inducerbar NO-syntase og samtidig opreguleres ekspresionen af flere antioxidative enzymer [18, 20, 27-30].

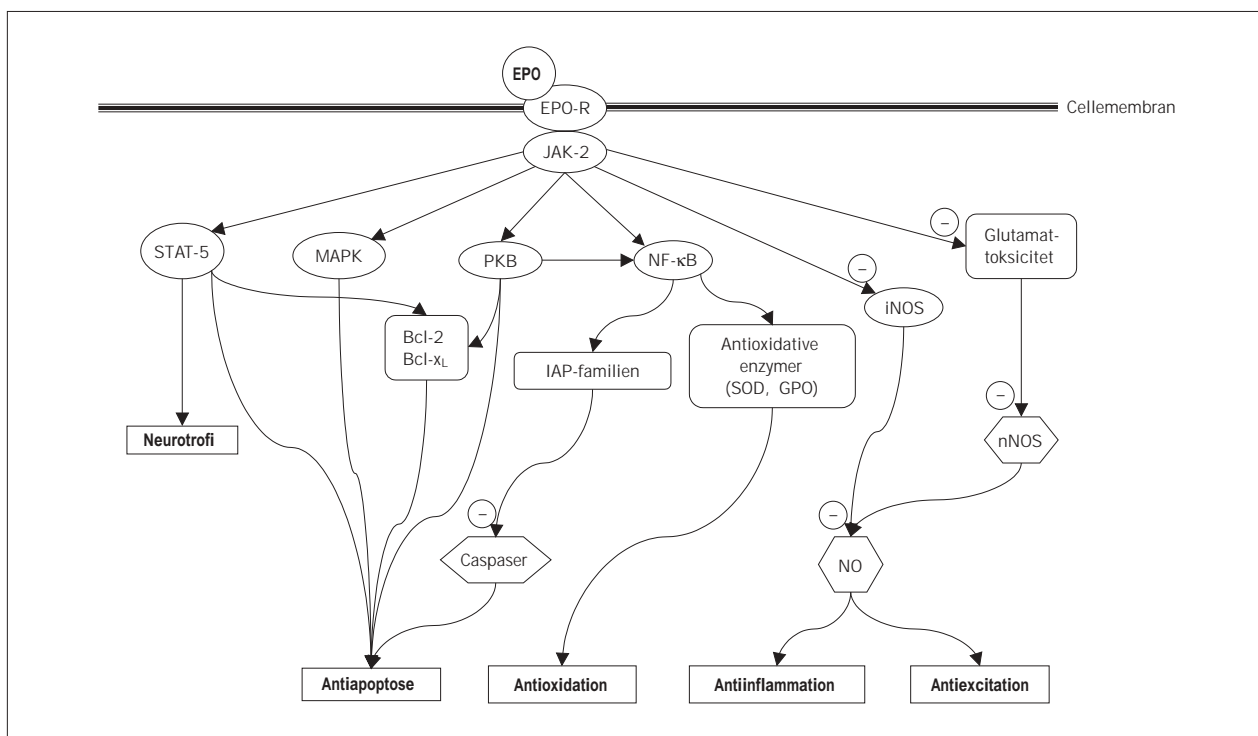


Fig. 1. Mulige intracellulære mekanismer ved erythropoietin (EPO)'s neuroprotektive virkninger. Binding af EPO til dets specifikke receptor (EPO-R) aktiverer *Janus tyrosine kinase 2* (JAK-2)-proteinet. Dette igangsætter en aktivering af multiple intracellulære signalveje, som bl.a. involverer *signal transducers and activators of transcription* (STAT-5), *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), *protein kinase B* (PKB) og *nuclear factor* (NF)- κ B. Herved sker en opregulering af de antiapoptotiske medlemmer af Bcl-familien, Bcl-2 og Bcl- χ_L , og af proteinfamilien *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP). IAP-familiens proteiner hæmmer specifikt aktiverede apoptosefremmende caspaser. En vedholdende aktivering af NF- κ B inducerer en øget dannelse af antioxidative enzymer, bl.a. superoxid-dismutase (SOD) og glutationperoxidase (GPO). EPO nedsætter toksiciteten af glutamat og hermed dannelsen af neuronalt nitrogenoxidsyntase (nNOS). I celler fra glat muskulatur nedsætter EPO den cytokin-medierede opregulering af inducerbar nitrogenoxidsyntase (iNOS).

Behandling med rekombinant, humant erythropoietin reducerer neuron-skaden i dyreeksperimentelle modeller af akut cerebralt insult.

Rekombinant, humant erythropoietin er et atoksisk lægemiddel og dets neuroprotektive potentiale kan umiddelbart testes i kliniske forsøg.

Patologiske cerebrovaskulære ændringer i form af vasospasmer og forstyrret autoregulering af den cerebrale blodgennemstrømning bidrager efter SAH eller hovedtraume afgørende til udviklingen af sekundær cerebral iskæmi [31]. Den cerebrovaskulære dysfunktion karakteriseres af et inflammatorisk respons med nedsat dannelse af endotelderivret NO og øget ekspresion af endoteliale adhæsionsmolekyler [8, 31]. I dyreeksperimentelle modeller er systemisk administration af rHuEPO fundet at kunne reducere antallet af inflammatoriske celler efter et stump traume [11] og at kunne normalisere den cerebrale autoregulation efter SAH (23). I betragtning af EPO's antiinflammatoriske virkninger i vaskulært væv [24-30] er det muligt at en væsentlig del af EPO's neuroprotektive virkninger in vivo er sekundære til en gunstig virkning på endoteliale receptorer, uafhængigt af en evt. passage over blod-hjerne-barrieren.

EPO besidder desuden angiogenetiske og neurotrofiske egenskaber, som menes at medvirke ved ophelelsen efter et hypoksisk/iskæmisk insult [12, 19, 32-34]. En neurotrofisk sekvens, som er adskilt fra de hæmatopoietiske domæner, og som muligvis medierer de neurotrofiske virkninger af EPO, er for nylig blevet påvist [35].

Perspektiver

Den nye viden om EPO's antiinflammatoriske og neuroprotektive virkninger vil uden tvivl få stor betydning for den neurobiologiske forskning fremover. Opdagelsen er imidlertid særlig interessant, fordi vi råder over en indregistreret, rekombinant human form af EPO, som efter tretten års anvendelse i behandlingen af anæmi hos millioner af patienter har vist sig at være et atoksisk lægemiddel med yderst få bivirkninger. De i dyreforsøgene virksomme, neuroprotektive doser overstiger ikke væsentligt dem, som i dag anvendes til behandling af f.eks. patienter med knoglemarvskræft. De neuroprotektive og antiinflammatoriske virkninger af EPO indtræder timer til dage efter administration af enkelt-doser, mens den erythropoietiske virkning kun opnås efter ugers vedvarende behandling med EPO, og hos raske forsøgspersoner ses der ingen bivirkninger selv efter administration af meget høje enkelt-doser [36]. Hos uræmiske patienter kan der efter måneders behandling med EPO optræde tromboemboliske komplikationer og arteriel hypertension, men dette betragtes dog som acceptabelt i forhold til den veldokumenterede terapeutiske gevinst [37]. Ved en bolusbehandling vil risikoen for sådanne uønskede virkninger formentlig være reduceret væsentlig.

EPO-R opreguleres i penumbrazonen efter et iskæmisk insult [5, 17], og det er muligt, at behandling med rHuEPO kan

forstærke et utilstrækkeligt endogent forsvar mod neuronal celledød. For at virke neuroprotektivt og antiinflammatorisk skal EPO tilsyneladende administreres inden insultet eller tidligt under udviklingen af et (neuro)inflammatorisk respons. Dyreforsøg tyder på et terapeutisk vindue på op til seks timer efter et hovedtraume eller et iskæmisk insult [11], og at virkningen af en bolus holder sig i mindst tre dage [19]. Dette er foreneligt med, at EPO igangsætter en nydannelse af protektive proteiner. Det er foreslået, at en endogen, hypoksiinduceret opregulering af EPO-syntesen indgår i det velkendte fænomen hypoksisk prækonditionering, hvor en kortvarig, mild hypoksisk eksposition beskytter mod efterfølgende, sværere ekspositioner [25]. Farmakologisk prækonditionering med rHuEPO kan således udgøre en attraktiv terapeutisk strategi i den profylaktiske behandling af sekundær cerebral iskæmi efter f.eks. hovedtraumer eller SAH.

Andre muligheder for udnyttelse af EPO's virkninger kunne være præoperativ administration ved koronar by-passkirurgi eller andre operationer med øget risiko for postoperativ hjerneskade. De nye opdagelser varsler et væld af terapeutiske muligheder, og kliniske forsøg, som inden for de næste år vil vise, om EPO også er neuroprotektivt hos mennesker, er undervejs.

Summary

Louise Vennegaard Kalialis & Niels Vidiendal Olsen:

Erythropoietin: a new job for an old friend.

Ugeskr Læger 2003;165:2477-81.

Erythropoietin (EPO) is a cytokine which is commonly associated with its central role in erythropoiesis. The clinical applications of the recombinant hormone are currently restricted to the treatment of anemia in renal failure and cancer. Recent studies, however, have suggested a new role for EPO as an anti-inflammatory and neuroprotective drug. EPO and its receptor are expressed in neurons, glial cells and brain capillary endothelial cells, and the system is upregulated in conditions of cerebral ischaemia and hypoxia. Animal studies have now established that intracerebroventricular administration of recombinant EPO exerts neuroprotection in models of stroke. The mechanisms appear to involve an upregulation of specific anti-apoptotic and anti-inflammatory pathways. In addition, neurotrophic and angiogenetic effects of EPO may contribute in a long latency protection. Interestingly, also systemic administration of recombinant EPO ameliorates neuronal damage after brain ischaemia, and prevents the loss of autoregulation of cerebral blood flow following

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

experimental subarachnoid haemorrhage. Recombinant human EPO is a safe and non-toxic drug, and clinical studies are currently investigating the neuroprotective potential of EPO in humans.

Reprints: *Niels Vidiendal Olsen*, Neuroanæstesiologisk Klinik 2091, Neurocentret, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø.

Antaget den 20. marts 2003.

H:S Rigshospitalet, Neurocentret, Neuroanæstesiologisk Klinik.

Litteratur

- Tan CC, Eckardt KU, Firth JD et al. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 1992;263:F474-81.
- Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3717-20.
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996; 8:666-76.
- Juul SE, Anderson DK, Li Y et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998;43:40-49.
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:643-51.
- Bernaudin M, Bellail A, Marti HH et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000;30:271-8.
- Masuda S, Okano M, Yamagishi K et al. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994;269:19488-93.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999;79:1431-568.
- Masuda S, Nagao M, Takahata K et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. *J Biol Chem* 1993;268:11208-16.
- Morishita E, Masuda S, Nagao M et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997;76:105-6.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10526-31.
- Yamaji R, Okada T, Moriya M et al. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem* 1996; 239:494-500.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285:1-24.
- Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B et al. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;81:29-42.
- Marti HH, Gassmann M, Wenger RH et al. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 1997;51:416-8.
- Siren AL, Knerlich F, Poser W et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; 101:271-6.
- Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:26-32.
- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4635-40.
- Siren AL, Fratelli M, Brines M et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4044-49.
- Calapai G, Marciano MC, Corica F et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 2000;401:349-56.
- Alafaci C, Salpietro F, Grasso G et al. Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* 2000;406:219-25.
- Buemi M, Grasso G, Corica F et al. In vivo evidence that erythropoietin has a neuroprotective effect during subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* 2000;392:31-4.
- Springborg JB, Ma X, Rochat P et al. A single subcutaneous bolus of recombinant erythropoietin normalizes cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid hemorrhage in rats. *Br J Pharmacol* 2002;135:823-9.
- Celik M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2258-63.
- Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001;412:641-7.
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:503-14.
- Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D et al. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol* 2000;59:419-25.
- Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G et al. Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol* 1999;127:482-8.
- Kusano E, Akimoto T, Inoue M et al. Human recombinant erythropoietin inhibits interleukin-1beta-stimulated nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production in cultured rat vascular smooth-muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:597-603.
- Akimoto T, Kusano E, Muto S et al. The effect of erythropoietin on interleukin-1beta mediated increase in nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 1999;17:1249-56.
- Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* 1998;78:53-97.
- Ribatti D, Presta M, Vacca A et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neo-vascularization in vivo. *Blood* 1999;93:2627-36.
- Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M et al. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem* 1999;72:2565-72.
- Konishi Y, Chui DH, Hirose H et al. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res* 1993;609:29-35.
- Campana WM, Misasi R, O'Brien JS. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med* 1998;1:235-41.
- Cheung WK, Goon BL, Guilfoyle MC et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:412-23.
- Luft FC. Erythropoietin and arterial hypertension. *Clin Nephrol* 2000;53: S61-4.