



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

LİPOLİSAKKARİT UYGULANAN SIÇANLARIN RENİN-
ANJİYOTENSİN SİSTEMİNDEKİ KONNEKSİNLERİN
DAĞILIMINDA ASKORBİK ASİDİN ROLÜ

Tuğba KAŞKAVALCI

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı


DANIŞMAN
Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANŞEL

Temmuz, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 11.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

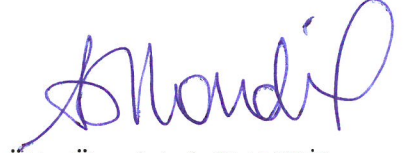
Tez Jürisi



Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Hatice YORULMAZ
Haliç Üniversitesi
Hemşirelik Yüksekokulu



Dr. Öğr. Üyesi Aslı KANDİL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 43412 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, LPS uygulanan sıçanların böbreklerinde renin üreten hücrelerde renin salınımında rol alan konneksin proteinlerinin dağılımına askorbik asitin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın ilk aşamasından son aşamasına kadar bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü konuda yardımcı olan, insani ve ahlaki değerlerini örnek aldığım, motivasyon kaynağım danışman hocam Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL'e katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bildiklerini benimle paylaşan, yolumunu aydınlatan, tez çalışmamın her aşamasında desteğini benden esirgemeyen ve üzerimde çok büyük emeği olan canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı KANDİL'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın deneyleri esnasında bilgi birikimi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan, çalışmam üzerinde büyük emeği olan, her zaman olumlu yaklaşımıyla moral kaynağı kıymetli hocam Araş. Gör. Dr. Ayşegül KAPUCU'ya çok teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanma sürecinde her türlü yardımlarını ve desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Kadriye AKGÜN-DAR'a, Doç. Dr. Ebru GÜREL-GÜREVİN'e, Uzman Biyolog Gülin KORKMAZ'a, Biyolog Şeyma EREN'e ve tezimin biyokimyasal analizleri sırasında yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Huri BULUT'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her durumda destek olan, ilgi ve alakalarını benden hiçbir zaman esirgemeyen en değerlilerim olan anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2019

Tuğba KAŞKAVALCI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. ENDOTOKSEMİ.....	2
2.2. RENİN-ANJİYOTENSİN SİSTEMİ.....	5
2.3. GAP JUNCTIONLAR (GEÇİT BAĞLANTILARI) VE KONNEKSİNLER	6
2.4. KONNEKSİNLERİN GENEL FONKSİYONLARI	11
2.5. KONNEKSİNLERİN ÖZEL FONKSİYONLARI.....	11
2.6. BÖBREK HEMODİNAMİĞİNDE KONNEKSİNLERİN ROLÜ	14
2.7. TUBUGLOMERULAR GERİBİLDİRİM (TGF) SİNYALİZASYONUNDA KONNEKSİNLERİN ROLÜ	16
2.8. KONNEKSİNLERİN NEFRON BİRLEŞMESİNDEKİ ROLÜ	17
2.9. RENİN ÜRETİMİNİN VE SALGILANMASININ DÜZENLENMESİNDE KONNEKSİNLER.....	18
2.10. ASKORBİK ASİT	20
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	22
3.2. DENEY DÜZENEGİ VE CERRAHİ İŞLEMLER	22
3.3. DENEY PROTOKOLÜ	23
3.4. KAN PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	24
3.5. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR.....	24
3.5.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması.....	24
3.5.2. Doku Homojenizasyonu.....	24

3.5.3. Doku Homojenatlarında ve Plazma Örneklerinde Konneksin 40, Konneksin 43, Renin ve Anjiyotensin II Düzeylerinin Belirlenmesi.....	24
3.6. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR	25
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. HEMODİNAMİK BULGULAR	27
4.1.1. Ortalama Arteriyal Basınç (OAB) Değerleri	28
4.1.2. Kalp Vurumu Değerleri	29
4.2. KAN PARAMETRELERİNİN BULGULARI	30
4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	39
4.3.1. Doku ve Plazmadaki Renin Düzeyleri.....	39
4.3.2. Doku ve Plazmadaki Anjiyotensin II Düzeyleri.....	41
4.3.3. Doku ve Plazmadaki Konneksin 40 Düzeyleri.....	43
4.3.4. Doku ve Plazmadaki Konneksin 43 Düzeyleri.....	45
4.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR	63
EKLER.....	83
5.1.1. EK 1. Etik Kurul Karar Metni.	83
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.2.1:** Jukstaglomerular hücre ve renin salınması (Schweda ve diğ., 2007)..... 5
- Şekil 2.3.1:** Geçit bağlantı (GJ) kanallarının yapısı. A: Küçük sinyal moleküllerinin geçişine izin veren GJ kanalları ile birbirine bağlanan hücreler. B: Bir GJ, her biri 6 Cx alt biriminden (I - VI) oluşan iki bağlantıdan oluşur. C: Cx proteini dört adet transmembran bölgeye, iki hücre dışı ilmeğe (EL1 ve EL2) ve bir hücre içi ilmeğe (IL) sahiptir. D: Cx izoformlarının kombinasyonlarına bağlı olarak, üç tip GJ oluşur: homomerik / homotipik, homomerik / heterotipik ve heteromerik / heterotipik (Yao ve diğ., 2009)..... 7
- Şekil 2.3.2:** Geçit bağlantıları ve Cx hemikanalları. Cx hemikanalları, ATP gibi hücre içi molekülleri hücre dışı alanlara aktarır. Konnekson çifti, hücre içi küçük molekülleri transfer eden bir GJ kanalı oluşturur (Okamoto ve Suzuki, 2017)..... 7
- Şekil 2.3.3:** Jukstaglomerular aygıt (Sıvı Elektrolit Dengesi, Bölüm 39; <https://slideplayer.biz.tr/slide/11860440/>. [Ziyaret tarihi: 23.03.2019]. 9
- Şekil 2.3.4:** JGA yapısı ve hücreler arasındaki fonksiyonel ilişkiler. A: MDC'leri, jukstaglomerular granüler RSC'ler, VSMC'ler, mezangial hücreler (MC'ler) ve EC içeren 5 farklı hücre tipinden oluşur B: JGA'daki farklı hücre bölmeleri geçit bağlantılarıyla (GJ'ler) birbirine bağlanır. GJ'ler, böbrek otoregülasyonu sırasında sensör hücrelerinden (EC'ler ve MDC'ler) efektör hücrelere (VSMC'ler ve RSC'ler) sinyalleri iletir (Yao ve diğ., 2009). 10
- Şekil 3.3.1:** Deneysel çalışmada uygulanan işlemlerinin şematik olarak gösterilmesi. 23
- Şekil 4.1.1:** *In vivo* kayıt sisteminde kaydedilen hemodinamik parametreler; ortalama arteriyel basınç (mmHg) ve kalp vuruğu (vurum/dakika)..... 27
- Şekil 4.1.1.1:** Deney gruplarına ait ortalama arteriyel basınç (OAB) değerlerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kontrol grubuna göre; ++p<0.01, +++p<0.001, LPS grubuna göre; #p<0.05, ###p<0.001, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık. 28
- Şekil 4.1.2.1:** Deney gruplarına ait kalp vuruğu değerlerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri..... 29
- Şekil 4.2.1:** Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde pH düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, ***p<0.001, Kontrol grubuna göre; ++p<0.01, LPS grubuna göre; #p<0.05, ###p<0.01, ###p<0.001, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık. 33

Şekil 4.2.2: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde bikarbonat [$c\text{HCO}_3^-$ (P.st) $_c$] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p<0.05$, ** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, LPS grubuna göre; ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.	33
Şekil 4.2.3: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde baz fazlalığı [$c\text{Base}$ (Ecf)] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, LPS grubuna göre; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.	34
Şekil 4.2.4: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde $p\text{CO}_2$ düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p<0.05$, Kontrol grubuna göre, ++ $p<0.01$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	34
Şekil 4.2.5: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde $p\text{O}_2$ düzeyleri.	35
Şekil 4.2.6: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde $c\text{Na}^+$ düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, LPS grubuna göre; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.	35
Şekil 4.2.7: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde $c\text{Cl}$ düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p<0.05$, Kontrol grubuna göre; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.	36
Şekil 4.2.8: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde glikoz [$c\text{Glu}$] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Kontrol grubuna göre; + $p<0.05$, LPS grubuna göre; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.	38
Şekil 4.2.9: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde laktat [$c\text{Lac}$] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p<0.05$, *** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; + $p<0.05$, LPS grubuna göre; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.	38
Şekil 4.3.1.1: Deney gruplarına ait doku örneklerindeki renin düzeyleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	40
Şekil 4.3.1.2: Deney gruplarına ait plazma örneklerindeki renin düzeyleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	40
Şekil 4.3.2.1: Deney gruplarının doku örneklerinde Ang II değerleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; ++ $p<0.01$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	42

Şekil 4.3.2.2: Deney gruplarının plazma örneklerinde Ang II değerleri. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kontrol grubuna göre; ++p<0.01, +++p<0.001, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	42
Şekil 4.3.3.1: Deney gruplarının dokularındaki Cx40 değerleri.	44
Şekil 4.3.3.2: Deney gruplarının plazma örneklerinde Cx40 değerleri. *p<0.05, Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	44
Şekil 4.3.4.1: Deney gruplarının dokularındaki Cx43 değerleri.	46
Şekil 4.3.4.2: Deney gruplarının plazmalarındaki Cx43 değerleri.	46
Şekil 4.4.1: Deney gruplarına ait hayvanların böbrek dokusunda Cx40 reaksiyonu (HSCORE). *p<0.05, Kontrol grubuna göre; +p<0.05, LPS grubuna göre; ##p<0.01, LPS+AA grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	47
Şekil 4.4.2: Kontrol grubuna ait hayvanların böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu. Glomerulus (GL), distal tübül (DT), proksimal tübül (PT) ve pariyetal yaprak (→). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.	48
Şekil 4.4.3: LPS grubuna ait hayvanların böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu. Glomerulus (GL), distal tübül (DT), proksimal tübül (PT) ve pariyetal yaprak (→). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.	49
Şekil 4.4.4: LPS+AA grubuna ait hayvanların böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu. Glomerulus (GL), distal tübül (DT), proksimal tübül (PT) ve pariyetal yaprak (→). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.	50
Şekil 4.4.5: AA grubuna ait hayvanların böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu. Glomerulus (GL), distal tübül (DT), proksimal tübül (PT) ve pariyetal yaprak (→). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.	51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.5.1: Farenin renal arterlerinde konneksin dağılımının özetlenmesi (Wagner, 2008).....	13
Tablo 2.5.2: JGA'da bulunan hücrelerde konneksin dağılımları (Yao ve diğ., 2009).....	14
Tablo 4.2.1: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde baz fazlalığı [cBase (Ecf)], bikarbonat [cHCO ₃ ⁻ (P.st) _c], pH, pCO ₂ , pO ₂ , cNa ⁺ , cCl ⁻ düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kontrol grubuna göre; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.....	32
Tablo 4.2.2: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde laktat [cLac] ve glikoz [cGlu] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kontrol grubuna göre; +p<0.05, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.	37

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
μm	: Mikrometre
AA	: Askorbik asit
ABY	: Akut böbrek yetmezliği
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
AEC	: 3-amino-9-etilkarbazol
Ang I	: Anjiyotensin I
Ang II	: Anjiyotensin II
AT1	: Anjiyotensin tip I
AT2	: Anjiyotensin tip II
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca^{2+}	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cCl ⁻	: Klorür
cGlu	: Plazma D-glikoz konsantrasyonu
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cHCO_3^-	: Standart bikarbonat; pCO ₂ değeri 40 mmHg olan tam oksijenlenmiş 37 derecedeki kanda plazma bikarbonat düzeyi
cBase (Ecf)	: Standart baz fazlalığı, baz açığının <i>in vivo</i> ifadesi
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cLac	: Plazmadaki L-Laktat konsantrasyonu
Cx	: Konneksin
DT	: Distal tübül
EC	: Endotel hücresi
EL/EL	: Hücre dışı ilmek
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	: Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz
GL	: Glomerulus
GFR	: Glomerular filtrasyon oranı
GJ	: Geçit bağlantısı
H ₂ O ₂	: Hidrojen proksit

HRP	: Yaban turbu peroksidaz
IFN-γ	: İnterferon gamma
IL	: Hücre içi ilmek
IL-1	: İnterlökin 1
IL-8	: İnterlökin 8
IL-6	: İnterlökin 6
IP3	: İnositol 1,4,5-trisfosfat
ip	: İnteraperitoneal
iv	: İntervenöz
iNOS	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
JG	: Jukstaglomerular
JGA	: Jukstaglomerular aygıt
KCl	: Potasyum klorür
KDa	: Kilodalton
LPS	: Lipopolisakkarit
MDC	: Makula densa hücresi
MC	: Mezangial hücre
MEGJ	: Miyoendotelyal geçit bağlantısı
Mek (MAPKK)	: Mitojenle etkileşen protein kinaz K
mg/dL	: Miligram/desilitre
mg/kg	: Miligram/kilogram
ml	: Mililitre
mmHg	: Milimetre civa
mmol/L	: Milimol/litre
mol/L	: Mol/Litre
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
Na⁺	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NF-κB	: Nükleer faktör kabba B
ng/ml	: Nanogram/mililitre
NO	: Nitrik oksit
OAB	: Ortalama arteriyel basınç
P2X	: Purinerjik reseptör X
P2Y	: Purinerjik reseptör Y

PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözelti
pCO₂	: Parsiyel karbondioksit basıncı
PGI₂	: Prostosiklin 2
Pg / ml	: Pikogram mililitre
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PKR	: Protein kinaz R
pO₂	: Parsiyel oksijen basıncı
PT	: Proksimal tübül
RAAS	: Renin-anjiyotensin-aldosteron-sistemi
RAS	: Renin-anjiyotensin-sistemi
RSC	: Renin salgılayan hücre
SAA	: Serum amiloyid A
TGF	: Tübüloglomerular geribildirim
Thy1.1	: Timus hücre antijeni 1.1
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
UDP	: Uridin difosfat
VSMC	: Vasküler düz kas hücresi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİPOPOLİSAKKARİT UYGULANAN SIÇANLARIN RENİN- ANJİYOTENSİN SİSTEMİNDEKİ KONNEKSİNLERİN DAĞILIMINDA ASKORBİK ASİDİN ROLÜ

Tuğba KAŞKAVALCI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL

Endotoksemi, kandan kaynaklanan bakteriyel bir enfeksiyonun bir dokudan diğerine yayılarak, aşırı derecede hasara sebep olmasıdır. Bu durum hipotansiyon, damar daraltıcı ajanlara karşı azalan cevap, miyokardiyal fonksiyon bozukluğu, organ kanlanmasında bozulma ve yaygın damar içi pıhtılaşma ile karakterize edilir. Endotoksemi, akut böbrek yetmezliğine (ABY), hemodinamik bozukluklara, hipoperfüzyona, böbrek perfüzyonunda ve glomerular filtrasyonda azalmaya, böbrekte vasküler direncin artmasına neden olmaktadır. Endotoksemide, hem enfeksiyona bağlı olarak meydana gelen olaylar hem de dolaşımdaki değişiklikler, renin anjiyotensin sistemi (RAS)'nin de yer aldığı birçok sistemin uyarılmasına neden olmaktadır. RAS, kan basıncının ve hacim homeostazının fizyolojik olarak düzenlenmesinde, hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler hastalıkların patogenesinde kritik bir rol oynar.

Gap junctionlar (geçit bağlantıları-GJ)'ı oluşturan konneksin (Cx) proteinleri, böbrekte endotel hücre (EC)'lerinde, damar düz kas hücrelerinde ve jukstaglomerular aygıt (JGA)'ta bulunmaktadır ve RAS'ın düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir. GJ, Cx proteinlerinin birbirine sıkıca bağlanması ile oluşan hücreler arası bağlantı bölgeleridir. GJ'ler birçok doku ve organda özellikle epitel, kas ve sinir dokularında, hücreler arası haberleşme ve homeostazın sağlanmasında büyük önem taşımaktadır. Endotoksemide oksidatif hasar ve inflamasyon durumlarında koruyucu etkisinin bulunduğu bir antioksidan olan askorbik asit (AA)'in, RAS ile konneksin dağılımına olan etkileri hakkında yeterli veri bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, lipopolisakkarit (LPS) uygulanarak oluşturulan deneysel endotoksemi modelinde askorbik asidin RAS ile konneksin proteinleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda deney hayvanı olarak yetişkin 3 aylık (250-300 g) 30 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar, kontrol, LPS (2 mg/kg, intravenöz (iv)), LPS+AA (2 mg/kg LPS, iv ve 100 mg/kg AA, iv) ve AA (100 mg/kg, iv) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Deney süresince hayvanların hemodinamik verilerini (ortalama arteriyal kan basıncı (OAB) ve kalp vurumu) ölçmek için sağ karotid artere, kan örnekleri almak için sağ femoral artere, anestezi infüzyonu için sağ jugular vene ve madde uygulaması için sağ femoral vene kanül takıldı.

LPS uygulanmadan önce (T0, deney başlangıcında), LPS infüzyonunun sonunda (T1), LPS infüzyonu bittikten 1 saat sonra (T2) ve deney sonunda (T3) alınan kan örneklerinde pH, $c\text{HCO}_3^-$ (P,st) (standart bikarbonat), $c\text{Base}$ (Ecf) (standart baz fazlalığı), $p\text{CO}_2$ (parsiyel karbondioksit basıncı), $p\text{O}_2$ (parsiyel oksijen basıncı), $c\text{Na}^+$ (sodyum), $c\text{Cl}^-$ (klorür), $c\text{Glu}$ (Plazmadaki D-glikoz konsantrasyonu) ve $c\text{Lac}$ (Plazmadaki L-Laktat konsantrasyonu) düzeyleri ölçüldü. Deney sonunda alınan kan ve böbrek örneklerinde biyokimyasal olarak renin, anjiyotensin II (Ang II), Cx40 ve Cx 43 değerlerine bakıldı. Ayrıca böbrekte immünohistokimyasal olarak Cx40 dağılımı incelendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

LPS uygulamasıya endotoksemi oluşturulan grupta OAB'nin azaldığı, AA uygulamasının değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Kalp vurumu değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi. LPS grubunda, pH, $c\text{HCO}_3^-$, baz fazlalığı ve glikoz değerlerinin kontrol grubuna göre azaldığı, $c\text{Na}^+$ ve laktat değerlerinin ise arttığı belirlendi. LPS+AA grubunda ise kontrol grubuna göre laktat ve $c\text{Cl}^-$ değerlerinin arttığı, pH, $c\text{HCO}_3^-$ baz fazlalığı ve glikoz değerlerinin azaldığı tespit edildi. LPS grubunda, plazmada ve dokudaki renin ve Ang II düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı, Cx40 ve Cx43 düzeylerinin ise kontrole benzer olduğu belirlendi. LPS+AA grubunda, plazmada ve dokudaki renin ve Ang II düzeylerinin LPS grubuna göre azaldığı, Cx40 ve Cx43 düzeylerinin değişmediği ve kontrole benzer olduğu tespit edildi. İmmünohistokimyasal olarak Cx40 reaksiyonunun dağılımına bakıldığında, reaksiyonun LPS uygulanan gruplarda anlamlı bir değişiklik göstermediği, sadece AA grubunda arttığı belirlendi.

Sonuç olarak, çalışmamızda LPS uygulaması ile oluşturulan endotoksemi modelinde kan basıncındaki düşüşe bağlı olarak RAS'ın anlamlı bir şekilde uyarıldığı görülmüştür. AA uygulamasının ise kan basıncı üzerinde etkisinin olmadığı, ancak RAS üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. LPS uygulaması ile oluşturulan endotoksemi modelinde konneksin proteinlerine bakıldığında anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir. Sonuç olarak, endotoksemide RAS ile konneksinler arasındaki ilişkinin açıklığa kavuşabilmesi için farklı deneysel modellerde daha fazla araştırılmanın yapılması, RAS'ın patofizyolojik olaylardaki rolünün anlaşılmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

Temmuz 2019, 101 sayfa.

Anahtar kelimeler: Endotoksemi, LPS, Renin-anjiyotensin sistem, Konneksin, Askorbik asit.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

ROLE OF ASCORBIC ACID IN DISTRIBUTION OF CONNEXINS IN RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM OF LIPOPOLYSACCHARIDE-TREATED RATS

Tuğba KAŞKAVALCI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL

Endotoxemia is a process, which is caused by a bacterial infection existing in blood and spreading one tissue to another, which causes excessive damage. This is characterized with hypotension, decreasing response to vasoconstrictor agents, myocardial disorder, organs' blood feeding disorder and intravascular coagulopathy. Endotoxemia causes acute renal failure, hemodynamic disturbance, hypo perfusion, kidney perfusion, and decrease on glomerular filtration and increase on kidneys' vascular resistance. In Endotoxemia, both the incidents that take place depending on the infection and the changes in the circulatory causes several systems including Renin Angiotensin System (RAS) to be stimulated. RAS has an important role in regulating blood pressure and homeostasis, the volume physiologically and in pathogenesis of cardiovascular diseases.

Connexin (Cx) proteins that form gap junctions (GJ) are found in endothelium cells, straight vein muscle cells and juxtaglomerular apparatus in the kidney and it is known that it has a role in regulating RAS. GJs are connections between cells, which is formed by Cx proteins that are connecting each other tight. GJ has a great importance on many tissues and organs, especially on connection between cells and providing homeostasis in epithelium muscle cells and nerve tissue. In Endotoxemia, there is not enough data about the effects of ascorbic acid (AA), which is an antioxidant whose protective effects in the events of oxidative damage and inflammation on distribution of connexions in the RAS.

In this study, in the Endotoxemia model, which is formed by applying LPS, it is aimed to make a research about the effects of RAS and connexins.

In the study, 30 three months old adult male albino rats were used. The animals have been divided into four groups as control, LPS (2 mg/kg, intravenous (iv)), LPS+AA (2 mg/kg LPS, iv and 100 mg/kg AA, iv) and AA (100 mg/kg, iv). Cannulas have been installed to the animals in order to measure their hemodynamic data (Main Arterial Pressure (MAP) and heartbeat, one to femoral artery to take blood samples, one to jugular vein for infusion of anesthesia and to right femoral vein to apply injections.

The blood parameters, which have been taken before applying LPS (T0 at the beginning of the experiment) at the end LPS infusion (T1), after an hour LPS infusion (T2) and at the end of the experiment (T3), pH, $c\text{HCO}_3^-$ (P, st) (standard bicarbonate), cBase (Ecf) (standard base excess), $p\text{CO}_2$ (partial carbon dioxide pressure), $c\text{Na}^+$ (sodium), $c\text{Cl}^-$ (chlorine), cGlu (D-glucose concentration in plasma) and cLac (L- Lactate concentration in plasma) levels have been measured. In blood and kidney samples that have been taken at the end of the experiment. Biochemically renin, angiotensin II (Ang II), Cx40 and Cx43 have been measured. Moreover, distribution of cx40 in the kidney have been examined immunohistochemically. The data obtained have been evaluated statistically.

In LPS group, which was formed, Endotoxemia by LPS application decrease in mean arterial pressure but it has been observed that AA application has not caused any changes. It has been detected that there is no meaningful change of heartrate among the groups. In LPS groups, decrease in values of pH, $c\text{HCO}_3^-$, base excess and glucose values and increase in $c\text{Na}^+$ and Lactate value. In LPS+AA group compared to the control group, increase in lactate and $c\text{Cl}^-$, decrease in pH, $c\text{HCO}_3^-$, base excess and glucose values have been detected. In LPS groups, increase in renin and Ang II values in plasma and tissue and similarity in Cx40 and Cx43 values with the control group. In LPS+AA group, decrease has been detected in renin and Ang II levels compared to the LPS group and no change in Cx40 and Cx43 value and similarity with control group. When we look at the distribution of Cx40 reaction immunohistochemically, it has been detected that the reaction has never shown any meaningful change in LPS applied groups, only increase in AA group has been detected.

In conclusion, it has been seen that RAS has been stimulated depending on the decrease in the blood pressure in the Endotoxemia model, which has been formed by LPS application. It has been detected that AA has no effect on blood pressure but has an effect on RAS. In the Endotoxemia model, it has not been detected any meaningful change when Cx proteins observed. To sum up, in order to reveal the connection between RAS and connexins in Endotoxemia, to make more research on different experimental models is going to make a huge contribution to be understood the role of RAS on pathophysiological incidents.

July 2019, 101 pages.

Keywords: Endotoxemia, LPS, Renin-angiotensin system, Connexin, Ascorbic acid.

1. GİRİŞ

Bu çalışma, LPS uygulanan sıçanlarda RAS'daki konneksinlerden Cx40 ve Cx43'ün dağılımında ve enfeksiyon durumunda askorbik asitin nasıl bir etkisinin olduğunu araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmanın "Genel Kısımlar" bölümünde; endotoksemi, RAS, hücre bağlantılarından geçit bağlantıları, konneksin proteinleri ve askorbik asit hakkında bilgiler verilmiştir. LPS uygulanmasıyla oluşan endotoksemi tablosunun genel özellikleri ve RAS üzerindeki etkileri, ayrıca konneksin proteinlerinin genel yapılarıyla birlikte böbrekteki görevleri ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

"Malzeme ve Yöntem" bölümünde; çalışmada kullanılan hayvan sayısı, özellikleri ve deney grupları belirtilmiş, hemodinamik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal veriler açısından değerlendirilmiştir.

"Bulgular" bölümünde; laboratuvarında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen tüm veriler biraraya getirilerek ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

"Tartışma ve Sonuç" bölümünde ise, bizim bulgularımız şimdiye kadar yapılan diğer çalışmalardan elde edilen verilerle karşılaştırılarak tartışılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ENDOTOKSEMİ

Steril konak dokusuna mikroorganizmaların yayılması ve yayıldığı bölgelerde işlev bozuklukları meydana getirmesi ile beraber konak canlının gösterdiği reaksiyona enfeksiyon, enfeksiyonun sistemik hale gelmesine ise endotoksemi denir. Gram (-) bakteri hücre duvarının bir parçası olan LPS, endotoksin olarak da adlandırılır ve endotoksemiye neden olmaktadır. Gerekli semptomatik tedavi uygulamalarına rağmen düzeltilemeyen hipotansiyonun görüldüğü patofizyolojik sürece ise septik şok adı verilir. Virüs, mantar ve parazitler septik şoka neden olabilir (Yorgancı, 2005).

Bakteri gibi patojenik nitelikteki mikroorganizmaların dolaşım sistemine katılması ile sistemik bakteriyel enfeksiyondan kaynaklanan endotoksemi ve çoklu organ yetmezliği, yoğun bakım ünitelerinde en yaygın ölüm nedenleri arasındadır (Annane ve diğ., 2003). Endotoksemi, hipotansiyon, damar daraltıcı ajanlara karşı azalan cevap, miyokardiyal fonksiyon bozukluğu, organ kanlanmasında bozulma ve yaygın damar içi pıhtılaşma ile karakterize edilir (Levy ve diğ., 2003). Endotoksemide görülen dolaşım bozuklukları hücre hasarına neden olmaktadır. İnflamasyon ve hücresel hasarın moleküler mekanizması, sitokinler, eikosanoidler, nitrik oksit (NO), süperoksit ve peroksinitrit gibi araçların aşırı üretilmesi ile ilişkilendirilmektedir (Salvemini ve Cuzzocrea, 2002). Endotoksemnin genel özellikleri; yüksek ateş, bütün vücutta özellikle enfekte dokularda belirgin damar genişlemesi, kalp debisi yüksekliği, kan akışkanlığının azalması, doku hasarı sonucu oluşan alyuvarların aglütinasyonu ve vücudun pek çok bölgesinde mikro pıhtıların oluşmasıdır (Guyton ve Hall, 2007).

Lipopolisakkarit, immunolojide tanımlanan en iyi antijendir. LPS, Gram (-) bakterilerin hücre duvarlarının yapısında bulunan bir endotoksindir (Silhavy ve diğ., 2010). LPS enjeksiyonu ile oluşturulan deney modelleri sepsis veya endotoksemi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. LPS uygulanması sonucu, sistemik inflamasyon aktive olur ve sepsisin başlangıcındaki klinik belirtiler ortaya çıkar. Dolaşıma yeterince LPS geçtiğinde, savunma hücrelerince inflamatuvar cevap tetiklenir. LPS'nin yol açtığı endotoksemide çok çeşitli inflamatuvar sitokinler, araşidonik asit metabolitleri, trombojenik ajanlar ve diğer biyolojik olarak aktif araçlar salgılanır (Gil-de-Gómez ve diğ., 2017).

Endotoksemide sistemik hipotansiyon sonucu gelişen renal iske mi, ABY gelişiminden sorumlu tutulan çok önemli bir etmen olmakla birlikte tek faktör değildir. Endotoksemi sonucunda salınan sitokinler tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interlökin 1 (IL-1), interlökin 8 (IL-8) ve uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS)'ın üretimi artar. Bunun sonucunda, monosit, makrofaj ve nötrofil hücrelerinde artış görülür. Dolaşımında artan NO, endotoksemideki en belirgin hemodinamik değişiklik olan arteriyel vazodilatasyon ve sistemik vasküler dirençte azalmaya yol açar. Vazodilatasyon nedeniyle arteriyel dolumdaki azalma baroreseptörleri aktive eder; sonrasında merkezi sinir sisteminde sempatik aktivasyon ve arginin vazopressin salınımı meydana gelir, RAS yolu aktive olur. Tüm bunların sonucunda norepinefrin, arginin vazopressin ve anjiyotensin gibi vazokonstrüktör ajanların artışı ile birlikte kalp debisi de artar. Dolaşımın bütünlüğünü korumada önemli olan bu basamak aynı zamanda renal vazokonstrüksiyona yol açar ve ABY'ye zemin hazırlar (Makris ve Spanou, 2016). Deneysel bir endotoksemi modelinde renal denervasyonun ABY'ye karşı koruyucu olduğunun gösterilmesi nörohumoral yolun patogenezdaki önemini vurgulamaktadır (Gómez ve Kellum, 2019).

Dolaşımında artan vazokonstrüktör maddelerin yanında endotoksinin, primer olarak nefronlarda renal plazma akımını ve filtrasyon oranını azalttığı ve afferent arteriyollerde dirence yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, böbrekte de sitokinlere ve RAS yolu aktivasyonuna yanıt olarak intrinsik vazokonstrüktör maddelerin üretildiği (endotelin, tromboksan A2, lökotrienler ve trombosit aktive edici faktör) gösterilmiştir. Özellikle TNF- α etkisiyle salınan endotelinin renal vazokonstrüksiyon ve kapiller geçirgenlik yoluyla plazma hacmini azaltıcı etkisi bilinmektedir. Öte yandan, endotoksemi sırasında salınan intrinsik renal vazodilatatörlerin de miktarının azaldığı bildirilmektedir. TNF- α , IL-1 gibi proinflatuar sitokinler ve endotoksin tarafından uyarılma sonrasında mezangial ve endotel hücrelerinde iNOS anlatımı artar. Sonuçta, renal medullada NO miktarı artar ve afferent arteriyollerde vazodilatasyon meydana gelir. Ancak, NO'ya bağlı bu vazodilatasyonun siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezine bağlı olup, endotoksemik hayvan modeli çalışmalarında 24 saat içinde cGMP düzeyinin bazal seviyelere indiği ve vazodilatasyonun kısa sürdüğü gösterilmiştir. Diğer taraftan, endotoksemi ile ilişkili olarak gelişen endotel hücre hasarı nedeniyle de iNOS üretimi ve sonucunda renal vazodilatasyon olumsuz yönde etkilenir. Böylece, böbrekten salınan vazodilatatör ve vazokonstrüktör ajanlar arasındaki bu dengesizlik intrarenal vazokonstrüksiyon lehine işler. Farklı mekanizmalara bağlı olarak gelişen intrarenal vazokonstrüksiyon sonucu glomerüler

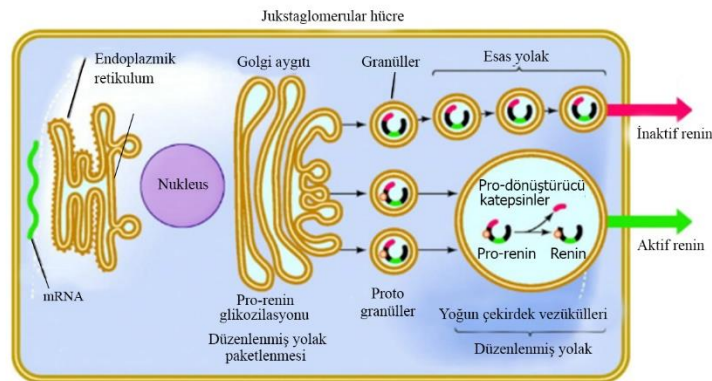
perfüzyon ve filtrasyon hızı azalır. Sistemik hipotansiyon ve intrarenal vazokonstrüksiyona bağlı olarak renal kan akımındaki azalma ve hipoksi sonucunda, endotokseminin erken döneminde prerenal ABY tablosu hakimdir. Bu dönemde renal tübüller etkilenmez ve idrarda sodyum atılımı azalır. Ancak, tablo ilerledikçe uzun süreli renal iskemiye bağlı tübüller hücre hasarı ve akut tübüller nekroz meydana gelir. Nekroz veya apoptoz sonrasında tübül epitelleri, bazal membrana olan adezyon özelliğini yitirdiklerinden, tübüller lümene atılırlar. Bu hücreler, idrarda tübüller epitel silendirleri [Silendir: böbrek tübüllerinde (distal toplayıcı kanallar) oluşan, silindirik puro şeklindeki oluşumlar] oluşturur. Bütün silendirler, bir renal mukoprotein olan Tamm-Horsfall proteininden oluşur. Tamm-Horsfall proteini Henle kulbunun distal ucundan ve toplayıcı kanallardan az miktarda salgılanır. Bu tür silendirler idrar akımında mikro düzeyde engellemelere neden olur (Mete, 2006). Endotokseminde meydana gelen ABY, hem hipotansiyon ve iskemiye hem serbest oksijen radikallerin hasarına hem de endotoksinin doğrudan etkilerine bağlı olabilir (Gómez ve Kellum, 2019).

ABY, fiziksel bir travma, enfeksiyon, inflamasyon veya toksisite kaynaklı ani olarak ortaya çıkan bir durumdur. ABY böbreklerde, atık maddelerin uzaklaştırılması, idrarın oluşması, elektrolitlerin korunması ve sıvı dengesinin düzenlenmesi gibi işlevlerini ani olarak kaybetmesi ile gelişen bir durumdur. Bu fonksiyon azalmasının şiddetine ve süresine bağlı olarak metabolik asidoz, hiperkalemi ve vücut sıvı dengesindeki değişiklikler ile birlikte birçok organ sistemi de etkilenmektedir (Makris ve Spanou, 2016).

Yoğun bakım hastalarının yaklaşık %35'inde görülen ABY, endotoksemi ile ortaya çıkmaktadır. Endotoksemi, venöz kapasitenin, venöz hacmin ve damar geçirgenliğinin artmasıyla meydana gelen hipovolemi ile hipotansiyona neden olmakta ve bu olaylar ile de karakterize edilmektedir. LPS infüzyonu böbrek hasarına, glomerular filtrasyon oranı (GFR)'nın azalmasına, kan üre nitrojen miktarının artmasına ve nötrofil infiltrasyonuna sebep olmaktadır. Sitokinlerin sistemik etkilerinin yanında, böbrekte direkt ya da dolaylı olarak hasara sebep olabilmektedir.

2.2. RENİN-ANJİYOTENSİN SİSTEMİ

RAS, sıvı basıncının düzenlenmesinde, vücudun sıvı ve elektrolit dengesinin ayarlanmasında görev alan önemli sistemlerden biridir (Ramkumar ve Kohan, 2016). RAS, böbrekte JGA hücrelerine giden sempatik sinirlerin uyarılması, renal kan akımının azalması ve tübüllerden geçen ultrafiltratın Na^+ düzeyinin azalması sonucu renin salınması ile aktive olmaktadır. Renin, 1898 yılında Robert Adolph Armand Tigerstedt ve Per Gustav Bergman tarafından keşfedilmiştir (Marks ve Maxwell, 1979; Hall, 2001). Renin küçük protein yapılı bir enzim olup jukstaglomerular (JG) hücrelerden salgılanmaktadır. İlk olarak pre-pro-renin (öncü renin) şeklinde oluşmakta ve Golgi aygıtında inaktif renin ve aktif renine dönüştürülmektedir (Şekil 2.2.1). Renin salgılanması hipotansiyon, hiponatremi ve hipovolemi ile tetiklenir (Timurkaynak, 2009). Kana geçen renin, karaciğerden salınan anjiyotensinojeni anjiyotensin I (Ang I)'e dönüştürür, bu da akciğer damar endotelinden salınan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ile anjiyotensin II (Ang II)'ye çevrilir. Ang II için anjiyotensin tip I (AT1) ve anjiyotensin tip II (AT2) olmak üzere en az iki tane reseptör alt tipi olduğu bilinmektedir. Ang II, kardiyovasküler, renal, nöronal, endokrin ve hepatik sistem üzerindeki etkilerini AT1 reseptörünün uyarılması ile gerçekleştirir. AT1 reseptörü, kalp, böbrek, düz kas hücreleri, beyin, böbreküstü bezinde, plateletler, yağ dokusu ve plasenta da bulunur (De Gasparo ve diğ., 2000). RAS'ın; damar duvarlarında, beyinde, böbrek üstü bezinde, hipofizde, ovaryumda, testiste, kalpte, plasantada, jejunumda, deride, uterusu, koryoamniyonda ve tükürük bezlerinde bulunduğu gösterilmiştir (Dzau, 1988; Dostal ve Baker, 1999).



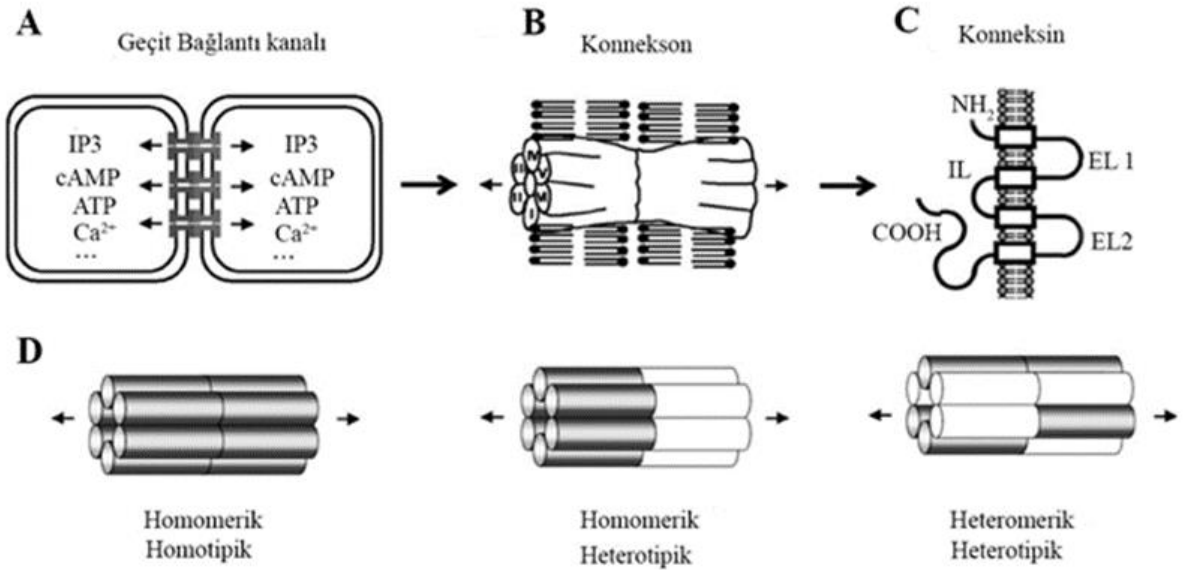
Şekil 2.2.1: Jukstaglomerular hücre ve renin salınması (Schweda ve diğ., 2007).

2.3. GAP JUNCTIONLAR (GEÇİT BAĞLANTILARI) VE KONNEKSİNLER

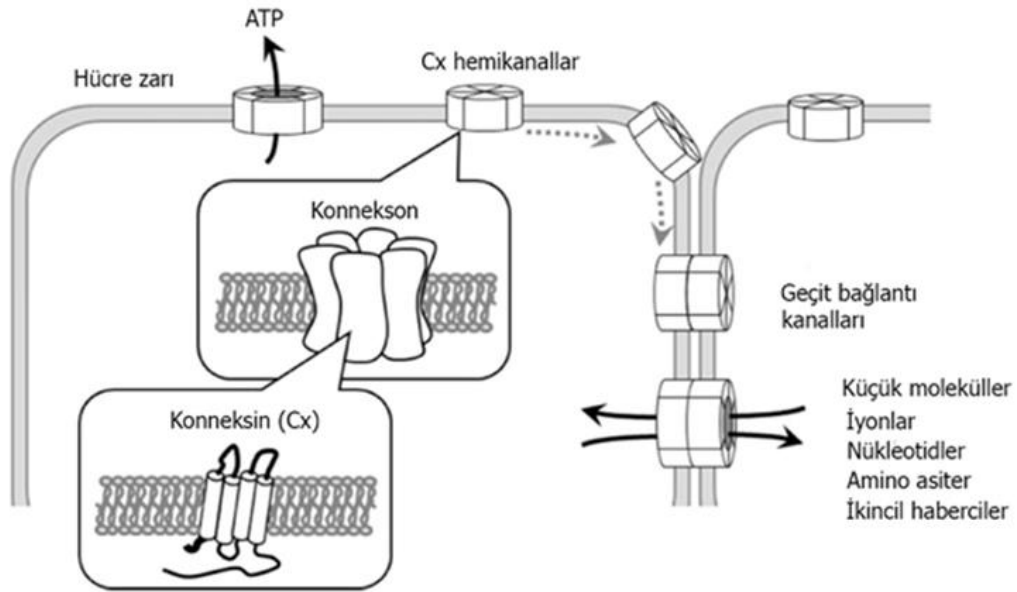
Çok hücreli canlılarda, komşu hücreler arası moleküllerin ya da maddelerin taşınması hücreler arası alanda ya difüzyon yoluyla ya da iki komşu hücre arasında bulunan kanallar aracılığıyla sağlanır. Birçok doku ve organda özellikle epitel, kas ve sinir dokularında, hücreler arası haberleşme ve homeostazın sağlanmasında komşu iki hücre arasında yer alan geçit bağlantıları (GJ) büyük önem taşımaktadır. GJ'ler, integral membran proteinleridir. İyonların ve düşük molekül ağırlıklı metabolitlerin komşu hücreler arasında direkt geçişini sağlamaktadır. Bu bağlantılar, ikincil habercilerin iletilmesini, elektriksel sinyallerin yayılmasını ve hücre sinyal iletiminin koordinasyonunu içeren önemli birçok fizyolojik olayda gereklidir (Beyer ve Berthoud, 2018).

GJ'leri oluşturan proteinler, omurgalılarda ve omurgasızlarda farklılık göstermektedir. Omurgasız hayvanlarda geçit bağlantı proteinleri inneksinlerden, omurgalılarda ise konneksin (Cx)'lerden oluşur (Phelan, 2005). Cx'ler ve inneksinler arasındaki amino asit dizisi homoloji göstermesede, Cx'ler inneksinlerle benzer yapısal özellikleri paylaşırlar. Omurgalılarda amino asit dizisi açısından benzerlik gösterebilen panneksin olarak adlandırılan bir protein daha tanımlanmıştır (Panchin, 2005). Panneksinler, aşırı miktarda anlatıldığında hücreler arası kanalları meydana getirebilirler. Ancak yapılan çalışmalar, doğal panneksinlerin, hücre dışı domainlerinde glikozillenmiş karbonhidrat ünitesine sahip olduğundan iki hücreyi birbirine bağlayan kanalları oluşturamadıklarını göstermiştir (Penuela ve diğ., 2007). Bu proteinlerin hemikanallar olarak etkisini sürdürdüğü ileri sürülmüştür (Gilchrist ve diğ., 2008).

Hücreler arası GJ'ler, sayıları birkaç taneden yüzlerce kümelere ulaşan kümeler halindeki Cx'lerin birbirine sıkıca bağlanması ile oluşan bağlantı bölgeleridir. Cx'ler tüm memeli hücrelerinde geniş bir dağılım gösterir ve hücreler arası iletişimin merkezini oluşturur (Saez ve diğ., 2003). Cx'ler, multigen ailesinden olan transmembran proteinlerdendir. Cx'lerin polipeptid zincirleri, amino asit dizilimleri nedeniyle hücre zarını dört defa geçer. Cx proteini, dört adet transmembran bölgeye, iki hücre dışı ilmek (EL) ve bir hücre içi ilmeğe (IL) sahiptir (Zhang ve Nicholson, 1994; Laird, 2006). Altı Cx proteini bir araya gelerek konneksin olarak da adlandırılan kanalları oluşturur (Şekil 2.3.1, 2.3.2) (Tuzcu ve diğ., 2010).



Şekil 2.3.1: Geçit bağlantı (GJ) kanallarının yapısı. A: Küçük sinyal moleküllerinin geçişine izin veren GJ kanalları ile birbirine bağlanan hücreler. B: Bir GJ, her biri 6 Cx alt biriminden (I - VI) oluşan iki bağlantıdan oluşur. C: Cx proteini dört adet transmembran bölgeye, iki hücre dışı ilmeğe (EL1 ve EL2) ve bir hücre içi ilmeğe (IL) sahiptir. D: Cx izoformlarının kombinasyonlarına bağlı olarak, üç tip GJ oluşur: homomerik / homotipik, homomerik / heterotipik ve heteromerik / heterotipik (Yao ve diğ., 2009).



Şekil 2.3.2: Geçit bağlantıları ve Cx hemikanalları. Cx hemikanalları, ATP gibi hücre içi molekülleri hücre dışı alanlara aktarır. Konnekson çifti, hücre içi küçük molekülleri transfer eden bir GJ kanalı oluşturur (Okamoto ve Suzuki, 2017).

İnsan genomunun analiziyle birlikte, hücreler arası haberleşmede rol alan Cx proteinlerinin gen ailesine ait dizilimi de ortaya konmuştur (Tuzcu ve diğ., 2010). İnsan genomunda 21, farelerde ise 20 farklı Cx geni bulunmuştur. Kemiricilerde ve insanlarda yaklaşık olarak 20 Cx izoformu bulunmuştur (Saez ve diğ., 2003). Cx'lerin molekül ağırlıklarının tespit edilmesi sınıflandırılmalarında önem taşımaktadır. Bu proteinler molekül ağırlıklarına (kilodalton, KDa) denk gelen sayılara göre adlandırılmıştır. Örneğin, birçok dokuda bulunan ve moleküler ağırlığı 40 KDa olan Cx, Cx40 olarak adlandırılmıştır (Wagner, 2008). Cx'lerin bazıları Cx26, Cx37, Cx40, Cx43 ve Cx45'dir.

Tüm dokularda Cx anlatımı yapılmaktadır. Fakat her dokuda anlatılan Cx tipi farklılık gösterir. Cx'ler aşırı miktarlarda sentez edilmelerine rağmen, yalnızca birkaç saatlik ömre sahiptirler. Cx'lerin zamana bağlı olarak dokudaki kontrolü, mRNA düzeyinin ayarlanması ve protein sentezi ile belirlenmektedir. Hücre zarında Cx'lerin ifade edilmesi ve GJ'leri düzenleyen mekanizmalar belirtilmiş, fizyolojik fonksiyonları gözden geçirilmiştir (Wagner, 2008).

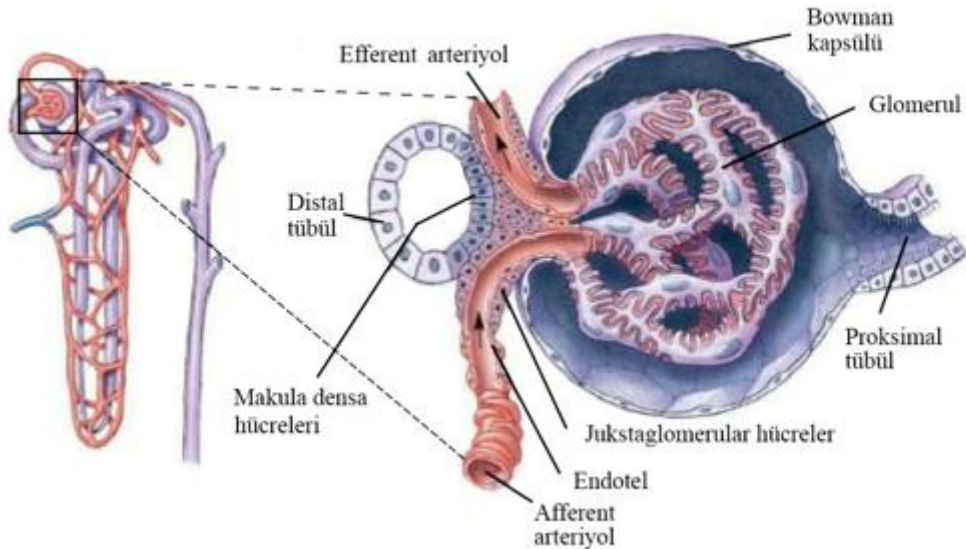
Cx monomerlerinin GJ'leri oluşturmak üzere hücreler arası kanalda bir araya gelmeleri birçok hücre içi faktörün etkisi altında olmaktadır. Bağlı olmayan konneksin hemikanalları fonksiyonel olarak hücre içi ve hücre dışı alanlarda moleküler alışverişe izin verir (Ebihara, 2003; Spray ve diğ., 2006). GJ kanalları kalsiyum (Ca^{+2}), Na^{+} , siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve adenozin trifosfat (ATP) gibi küçük moleküllerin ve iyonların geçişine izin verir (Spray ve diğ., 1982; Saez ve diğ., 1989).

JGA'da yoğun olarak bulunan Cx'lerin, böbrekte EC'lerde, damar düz kas hücrelerinde anlatımı değişen tipleri bulunmaktadır. Böbrekte Cx'lerin bulunması ilk defa elektron mikroskopu ile insanda 1960'ların başında gösterilmiştir (Biava ve West, 1966). O zamandan beri birçok çalışma, insan ve kemiricilerde bütün böbrek hücre tiplerinde Cx ailesinin bazı üyelerinin anlatımının yapıldığını ileri sürmektedir (Boll ve diğ. 1975; Wagner, 2008).

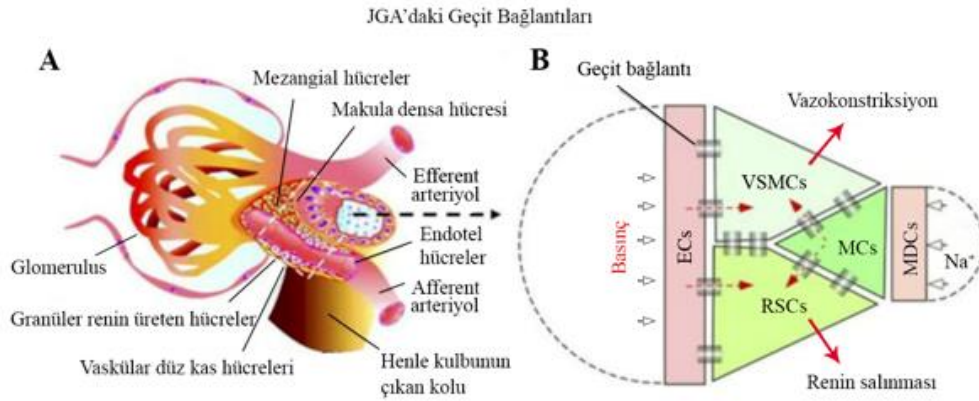
Sıçanlarda, farelerde ve insanlarda preglomerular damarlardaki EC'ler arasında Cx37, Cx40 ve Cx43 formundaki GJ bulunur (Arensbaek ve diğ., 2001; Braunstein ve diğ., 2009; Takenaka ve diğ., 2008). Cx40, en yoğun olarak preglomerular damarlardaki EC'lerde anlatılırken, afferent arteriyolün jukstakomerular bölümünde daha az anlatılır (Just, 2007). Cx37 anlatımı, afferent ve efferent arteriyoller ile renal arterdeki EC'lerde görülür (Haefliger ve diğ., 2001). Cx43 de afferent ve efferent arteriyoller ve renal arterde bulunur (Seul, 2000; Arensbaek ve diğ., 2001).

Fare damar düz kas hücrelerinde Cx45'in anlatıldığı ileri sürülmektedir (Hanner ve diğ., 2008). İnsan ve farelerle yapılan son çalışmalarda, preglomerular arteriyollerde ve ana arterlerde Cx45 anlatımı gösterilmiştir (Just, 2007).

GJ'ler, böbrekte nefronların fonksiyonlarını düzenleyen JGA'da bulunur (Şekil 2.3.3). JGA, afferent ve efferent arteriyol, ekstraglomerular mezangial hücreler ve Henle kulbunun çıkan kolunun distal bölümünde yer alan makula densa hücre (MDC)'leri, vasküler düz kas hücre (VSMC)'leri ve renin salgılayan jukstaglomerular granüler hücreler (renin salgılayan hücreler-RSC) dahil olmak üzere birçok farklı hücre tipini barındırmaktadır (Yao ve diğ., 2009) (Şekil 2.3.4A). Bu hücrelerden, MDC'ler ve EC'ler, sırasıyla Na⁺ konsantrasyonundaki ve kan basıncındaki değişiklikleri algılayan sensörler olarak hareket eder, afferent arteriyoldaki efektör hücrelere (VSMC'ler ve RSC'ler) sinyal gönderir ve böylece preglomerular vasküler tonusun ve renin salgısının düzenlenmesi sağlanır (Yao ve diğ., 2009) (Şekil 2.3.4.B). Bu benzersiz yapı, granüler hücrelerden renin salınmasını ve nefronda glomerular filtrasyon hızını düzenler (Inscho ve diğ., 1994; Just, 2007). Renin salgılayan hücreler, Cx40 (Hwan ve Beyer, 2000), Cx45 (Hanner ve diğ., 2008) ve Cx37 (Kurtz ve diğ., 2010)'den meydana gelen birbirine bağlı GJ'leri içerir. MC'lerde, Cx40 ve Cx37 (Stoessel ve diğ., 2009; Takenaka ve diğ., 2008) anlatımı ve insan mezangial hücrelerinde de Cx43 anlatımı yapılır (Wagner ve diğ., 2010).



Şekil 2.3.3: Jukstaglomerular aygıt (Sıvı Elektrolit Dengesi, Bölüm 39; <https://slideplayer.biz.tr/slide/11860440/> [Ziyaret tarihi: 23.03.2019].



Şekil 2.3.4: JGA yapısı ve hücreler arasındaki fonksiyonel ilişkiler. A: MDC'leri, jukstaglomerular granüler RSC'ler, VSMC'ler, mezangial hücre (MC)'leri ve EC içeren 5 farklı hücre tipinden oluşur B: JGA'daki farklı hücre bölmeleri geçit bağlantılarıyla birbirine bağlanır. GJ'ler, böbrek otoregülasyonu sırasında sensör hücrelerinden (EC'ler ve MDC'ler) efektör hücrelere (VSMC'ler ve RSC'ler) sinyalleri iletir (Yao ve diğ., 2009).

GJ kanallarının sentezi, birleşimi ve dönüşümü membran proteinlerinin genel salgı yollarını izler. Cx'ler membrana bağlı ribozomlar tarafından sentez edilirler ve eş zamanlı translasyonla endoplazmik retikulum membranına katılırlar. Cx'lerin konneksona (hemikanala) dönüşümü sürekli bir biçimde endoplazmik retikulumda başlar ve trans-Golgi ağında sonlanır, buna rağmen oligomerizasyonun kesin yeri Cx'in tipine bağlıdır. Cx43'ün trans-Golgi ağında oligomerleştiği düşünülürken, hem Cx26 hem de Cx32'nin endoplazmik retikulumda oligomerleştiği düşünülür (Musil ve Goodenough, 1993; Martin ve diğ., 2001). Daha sonra konneksonlar, plazma membranına birleşen mikrotübüller boyunca taşınan vesiküller tarafından hücre yüzeyine iletilirler. Plazma mebranı üstüne ulaşan konneksonlar ya bağlantısız bölgede konumlanırlar ya da karşı tarafta bir konneksonla tamamen fonksiyonel bir kanal oluşturmak için kenetlenirler. Konneksonlar homomerik (tek tip konneksinle oluşanlar) ya da heteromerik (birden çok tip konneksinle oluşanlar) olabilirler. Fonksiyonel kanallar, belirli konneksonlar (homomerik ya da heteromerik) tarafından oluşturulduklarında homotipik ya da farklı konneksonlar arasındaki etkileşim ile oluştuğlarında heteromeriktirler.

Genellikle Cx'lerin dönüşüm hızı diğer plazma membran proteinlerine nazaran çok hızlıdır. *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde yapılan çalışmalara göre, Cx26 ve Cx32'nin yarılanma ömürleri sırasıyla 2 ve 3 saattir (Traub ve diğ., 1983; 1987). GJ'lerin plazma membranından kaldırılması endositozla olur. Bu süreç boyunca, GJ'nin iki membranı da komşu hücrelerden biriyle birleşir böylece annular geçit bağlantıları olarak isimlendirilen çift membran vakuölüne şekillenir.

Daha sonra bu yapılar, hem lizozomlar hem de proteozomlarca parçalanır. Öncelikli parçalanma yolu hem hücre hem de Cx'in tipi ile ilişkilidir (Laird, 2005; 2006). Cx32'nin karaciğerde yıkımı başlıca lizozomal yol ile gerçekleşir (Rahman ve diğ., 1993). Cx'in fosforilasyona uğrayıp uğramaması, onun hücre membranına yerleşimi ve yıkılmasını düzenlemede çok önemlidir. Cx43'ün yerleşimi ve yıkımındaki mekanizmayı anlamak için *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, Cx43 GJ'nin, membrana yerleşimi ve yıkımının, onun hiperpolarizasyonu (Mek/Erk yolakları ile) ve ubiquitin eklenmesi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Leithe ve Rivedal, 2004).

2.4. KONNEKSİNLERİN GENEL FONKSİYONLARI

Alyuvarlar, trombositler, olgun iskelet kas fibrilleri ve spermatozoidler gibi birkaç doku dışında, GJ'ler tüm omurgalı hücre tiplerinde bulunur (Willecke ve diğ., 2002). Ancak, bazı Cx'lerin anlatımı doku ve hücre tiplerine göre değişiklik gösterir. Hücre-hücre kanalları, hücre büyümesi (Loewenstein ve Rose, 1992), salgı bezlerinde salgı üretiminin artması (Meda ve diğ., 1991) ve farklılaşması, gelişim süreçleri, tümörojenik süreçleri ve rejenerasyonu gibi birçok fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Wei ve diğ., 2004; Jiang ve Gu, 2005).

Cx genlerindeki mutasyonlar, Cx32 mutasyonunun (Krutovskikh ve Yamasaki, 2000; Zhou ve Griffin, 2003) neden olduğu X-kromozomuna bağlı Charcot-Marie-Tooth hastalığı (Bergoffen ve diğ., 1993), insanda Cx26 (Liu ve diğ., 1997) mutasyonu ile bağlantılı olan konjenital sağırılık ve deri hastalıkları ve Cx50 mutasyonundan etkilenen konjenital katarakt gibi birçok insan hastalıkları sayılabilir (Krutovskikh ve Yamasaki, 2000).

2.5. KONNEKSİNLERİN ÖZEL FONKSİYONLARI

GJ'ler, farklı hücreler arasındaki mekaniksel ve elektriksel bağlantıları gerçekleştirir. Kimyasal sinapslar yolu ile dolaylı ilettime ek olarak nöronal hücreler arasında internöronal iletişimin doğrudan gerçekleştiği GJ'lerin bulunduğu memeli sinir sistemi gibi benzer dokularda (Bennett ve Zukin, 2004; Nagy ve diğ., 2004; Montoro ve Yuste, 2004; Buzsáki ve Chrobak, 1995; Fricker ve Miles, 2001; Theis ve diğ., 2005) ve kalpte, kardiyomiyositlerin düzenli kasılmasında ve elektriksel uyarıların hızlı bir şekilde hücreden hücreye iletilmesinde GJ'ler oldukça önemli rollere sahiptir (Beyer ve diğ., 1987; De ve diğ., 1993; Gros ve diğ., 1994; Gros Jongsma, 1996; Coppen ve diğ., 1999a-b).

GJ'ler, damar sistemi içinde de bulunur. GJ aracılı iletişimin, kan damarı duvarındaki hücreler arasında iletişimi kolaylaştırması ve damar tonusunun düzenlenmesi gibi vasküler fonksiyonların kontrolünde önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (Christ ve diğ., 1996). EC'ler arasındaki GJ'ler, arteriyollerin EC'lerinde gerçekleşen vazomotor cevaba neden olan hücre içi sinyalleri iletebilir (Segal ve Duling, 1987). Vasküler hücrelerde anlatımı yapılan temel Cx'ler Cx37, Cx40, Cx43 ve Cx45'dir (Dhein, 1998; Gustafsson ve diğ., 2003).

Cx genindeki mutasyonlarla alakalı olduğu gösterilen insan hastalıklarına ek olarak, birçok inceleme, çeşitli Cx'lerin eksik olduğu hayvanlar üzerinde fizyolojik fonksiyonlarını belirlemek amacı ile ele alınmıştır. Örneğin, vasküler Cx'lerinde genetik bozukluk olan farelerde, vazomotor cevapların yayılmasında ve damar tonusunda anormallikler görülmüştür. Böylece, Cx40 içermeyen fareler hipertansiyon sergilemekte ve arteriyoller (de Wit ve diğ., 2000) boyunca endotel bağımlı vazodilatör yanıtları bozulmuş iletim göstermektedirler. Bu yalnızca Cx40'ın kan basıncının kontrolünde değil, damar genişlemesinin yayılmasında da önemli rolü olduğuna işaret etmektedir.

EC'lerinde Cx43'ü eksik olan fareler, Cx43 gen bozukluğunun neonetal ölümcül etkilerini savuşturmakta ki bu da normotensif (de Wit ve diğ., 2000; de Wit ve diğ., 2003) veya hafif hipotensif (Liao ve diğ., 2001) olarak tanımlanmıştır. Cx45 eksikliği bazı damarların daralmasına ve erken ölüm ile sonuçlanan gelişimde vasküler bozulmalara ve düz kas hücrelerindeki çeşitlenmenin durdurulmasına sebep olmaktadır (Kruger ve diğ., 2000). Bu deneylerden elde edilen gözlemler, Cx'lerin fizyolojik önemine veya daha ziyade vasküler fonksiyonun gelişiminde ve düzenlenmesinde GJ'leri işaret etmektedir.

Renal damarlar sadece renal kan akımını düzenlemeyi değil aynı zamanda glomerular cevabın kontrolünde de yer almaktadır, böylece böbrek GJ'lerinin incelenmesi için ilginç bir böbrek damar sistemi oluşturmaktadır. Damar sistemi içindeki GJ'lerin dağılımı için yapılan bir dizi çalışma ile damar duvarlarında anlatılan en önemli GJ'lerin Cx37, Cx40, Cx43 ve Cx45 olduğu tespit edilmiştir. GJ'lerin, tüm kan damarlarında eşit anlatımı yapılmaz ve farklı türler arasında da farklılıklar gösterir. Arteriyal EC'lerde çoğunlukla Cx37 ve Cx40 anlatımı olurken, düz kas hücrelerinde Cx43 ve Cx45 anlatımı olur. Büyük böbrek damarlarında (örneğin böbrek interlobar ve kavisli arterlerde) Cx izoformlarından Cx37, Cx40 ve Cx43 endotel tabakasında bulunur (Hwan ve Beyler, 2000; Haefliger ve diğ., 2004; Zhang ve Hill, 2005; Wagner ve diğ., 2007) ancak, Cx43 zayıf ve düzensizdir. Bu bulgu, sıçan aort veya karotid arterinin (Yeh ve

diğ., 1997; Hong ve Hill, 1998) endotelindeki Cx43'ü gösteren önceki çalışmalar ile uyumludur, fakat buna karşın son yapılan bir çalışmada önemli türler ve doku farklılığı gösteren fare aort EC'lerinde (Simon ve diğ., 2004) Cx43 bulunmamıştır. Ancak, literatürde mevcut büyük böbrek damarlarında bulunan Cx'ler ile ilgili bilgiler yetersiz ve kafa karıştırıcıdır. Genellikle düz kas hücrelerinde büyük arterlerde Cx37, Cx40, Cx43 ve Cx45 (Haefliger ve diğ., 2004) tarif edilmesine rağmen, büyük böbrek arterlerinde Cx anlatımı hala belirsizdir. Şu anda, büyük böbrek arterlerinde ifade edilen Cx43 ve Cx37 hakkında immünohistokimyasal bir kanıt yoktur (Barajas ve diğ., 1994; Zhang ve Hill, 2005) (Tablo 2.5.1).

Tablo 3.5.1: Farenin renal arterlerinde konneksin dağılımının özetlenmesi (Wagner, 2008).

	Büyük Renal Arterler		Renal Arteriyoller		
	Endotel	Media	Endotel	Media	Renin Üreten Hücreler
Cx37	++	+	++	-	+
Cx40	+++	-	+++	-	+++
Cx43	+	+	+	+	-

Böbrek arteriyollerin EC'lerinde Cx37 ve Cx40 anlatımı yapılırken Cx43 anlatımı daha azdır (Hwan ve Beyer, 2000; Haefliger ve diğ., 2001; Haefliger ve diğ., 2004; Zhang ve Hill, 2005). Afferent arteriyollerde Cx alt tiplerinden Cx37 ve Cx43 anlatılır, fare preglomerular damarlarında ise sadece Cx37 bulunur (Zhang ve Hill, 2005), sıçanda ise bulunmaz (Arensbak ve diğ., 2001). Sıçan ve insan böbrek araştırmalarında, afferent arteriyollerin düz kas hücrelerinde Cx43 anlatımı ya hiç gösterilmedi (Hillis ve diğ., 1997b; Haefliger ve diğ., 2001; Arensbak ve diğ., 2001) ya da sadece afferent arteriyollerin mediasında çok az bulunmuştur (Hwan ve Beyer, 2000). Endotelin de afferent arteriyollerin proksimal kısımları Cx40, Cx37'de tipik, Cx43'de zayıf anlatım göstermesine rağmen, bu Cx izoformları aracılığı ile Cx40, düz kas hücre tabakası içinde bulunabilir, damarların distal bölgelerinde tespit edilebilir (Arensbak ve diğ., 2001).

Cx40 immünoaktivitesi sadece JGA'daki renin üreten hücrelerde değil, modifiye düz kas hücreleri, intraglomerular ve ekstraglomerular hücrelerde de görülür (Hwan ve Beyer, 2000; Haefliger ve diğ., 2001; Haefliger ve diğ., 2004; Zhang ve Hill, 2005; Wagner ve diğ., 2007). Cx37 hem renin üreten hücrelerde hem de vasküler kutup yakınındaki ekstraglomerular mezangial hücrelerde mevcuttur (Zhang ve Hill, 2005) (Tablo 2.5.2).

Tablo 2.5.2: JGA'da bulunan hücrelerde konneksin dağılımları (Yao ve diğ., 2009).

Jukstaklomerular Ağıt – JGA	
Hücre Tipi	Konneksin
Ekstraklomerular mezangial hücreler	Cx37, Cx40, Cx43, Cx45
Düz kas hücreleri	Cx37, Cx40, Cx43, Cx45
Endotel hücreleri	Cx37, Cx40, Cx43
Renin üreten hücreler	Cx37, Cx40, Cx45

2.6. BÖBREK HEMODİNAMİĞİNDE KONNEKSİNLERİN ROLÜ

Böbrek kan akımının kontrolü; sempatik sinirler, endotelial fonksiyon ve otonom regülasyon mekanizmaları tarafından belirlenir. İkincil olarak ise sıklıkla Bayliss mekanizması ve tübüloglomerular geribildirim (TGF) olarak bilinen başlıca miyojenik bir bileşeni içerir. Miyojenik cevap, voltaj bağımlı kanalların açılmasıyla ve Ca^{+2} 'un içeri akımıyla oluşan depolarizasyon tarafından aktive oluyorsa, Ca^{+2} 'un elektrotonik difüzyonunu afferent arteriyollerin mediası ile bağlantı kuran GJ'lere doğru olabileceği düşünülmektedir (Rummery ve Hill, 2004). Aslında, literatürlerdeki çeşitli çalışmalar, afferent arteriyollerdeki düz kas hücrelerinin elektriksel eşleşmeleri, elektrofizyolojik metodların kullanılmasıyla doğrulanmıştır (Buhrle ve diğ., 1986; Russ ve diğ., 1999). Bu varsayım, alfa-glisiretinik asit inhibitörüyle önemli ölçüde bozulmuş miyojenik vazokonstriksiyon tarafından GJ'lerin eşleşmemesi sonucu nöronal arterlerdeki iletim, çalışmalarla daha fazla desteklenir (Lagaud ve diğ., 2002; Busse ve Fleming, 2003). Ancak Bayliss etkisine aracılık eden Cx proteinlerinin ilişkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır.

Düz kas hücrelerinin kasılma durumu, NO, prostoglandinler veya endotel-kaynaklı hiperpolarize edici faktörü kapsayan vazoaaktif maddelerin endotelden salınımıyla daha fazla düzenlenebilir (Taylor ve Weston, 1988). Düz kas hücreleri üzerindeki otakoidlerin gevşemesine direkt olarak ara plakla beraber eşlenen EC'leri olan miyoendotelial geçit bağlantısı (MEGJ)'nin aracılık etmesi düşünülebilir. MEGJ'ler, vazotonus kontrolünü kapsayan ekstrarenal vasküler dokularda, çoğunlukla küçük arteriyollerde tanımlanmıştır (Emerson ve diğ., 2000; Sandow ve diğ., 2002). Renal damarlarda, MEGJ'ler arasında normal düz kas hücreleri ile EC'lerin varlığına kanıt olmamasına rağmen (Haefliger ve diğ., 2001), Cx40 içeren GJ'ler endotel ve renin üreten hücrelerde mevcuttur. NO veya prostosiklin 2 (PGI_2)'nin endotelden düz kas hücrelerine difüzyonuna rağmen sonra meydana gelen gevşeme

GJ blokaşlarından etkilenmemiştir (McGuire ve diğ., 2003). Buna karşılık endotel-kaynaklı hiperpolarize edici faktörün aktivasyonu GJ'lerin eşleşmesine bağlı görünür (Evans ve Boitano, 2001). Vazomotor cevaba aracılık eden belli Cx'ler hakkındaki bilgi sınırlıdır ve sadece MEGJ'lerde Cx37 ve Cx40'ın oluşununun tarif edildiği sıçan mezenterik ve basiller arter gibi ekstrarenal dokularda yapılan çalışmalar aracılığıyla ulaşılabilir (Sandow ve diğ., 2006; Haddock, 2006). İnsan subkutan arteriyollerinde endotel-kaynaklı hiperpolarize edici faktörün uyardığı vazodilatasyonun, Cx43'e bağlı olduğu mimetik peptid 40Gap²⁶'nın kullanımıyla gösterilmiştir. Mikrodolaşımda vazomotor cevap, kan akışı gerekliliğine göre arteriyollerin akıma karşı kasılması ya da gevşemesi, damar duvarında yüzey boyunca yayılabilir. Vazodilatasyon ve vazokonstriksiyonun yayılması, GJ'lere (Segal ve Duling, 1987) doğru akan ve arteriyollerde hem endotel hem de düz kas hücrelerini eşleyen hiperpolarize veya depolarize akımın elektriksel iletimine bağlıdır. Depolarizasyon akımının iletimi, afferent arteriyol direncinde yeterli yükselmeyi sağlamak için lokal vazokonstriksiyonun yaklaşık 1500 µm (Wagner ve diğ., 1997) mesafenin üzerinde yayılmasına neden olan potasyum klorür (KCl)'ün mikro uygulanması ile sıçan renal afferent arteriyollerinde gösterilmiştir (Gustafsson ve Holstein-Rathlou, 1999). Vazodilatasyonun yayılımının intrasellüler eşleşmeye bağlı olduğu da gösterilmiştir. Cx40'ı eksik olan farenin iskelet kası arteriyollerinde vazodilatasyonun yayılımı belirgin biçimde zarar görür ve vazodilatör cevabın Cx40 aracılığıyla hücre eşleşmesini gerçekleştirmesinin gerekliliği öne sürülür (de Wit ve diğ., 2000; Figueroa ve diğ., 2003). Sorun, vazomotor yanıtların endotel boyunca veya arteriyollerin mediası boyunca iletilip iletilmemesiyle devam eder. Bu sorunu araştırmak için devam eden çalışmalarda, farede hem endotel hem de düz kas hücrelerindeki kesinti, vazodilatasyonun endotel boyunca yayıldığını, oysa vazokonstriksiyonun lokal olarak gerçekleştiğini göstermiştir (Emerson ve diğ., 2000; Bartlett ve Segal ve diğ., 2000). Bu varsayım, baskın endotel Cx proteini olarak bilinen Cx40'ın eksik olduğu fareler de vazodilatasyonun azalmış iletimi ile açıklanabilir (de Wit ve diğ., 2000). Böbrekte vazomotor cevapların düzenlenmesinde spesifik Cx'lerin rolü, halen bilinmemekte ve daha fazla araştırmayı gerektirmektedir.

2.7. TUBUGLOMERULAR GERİBİLDİRİM (TGF) SİNYALİZASYONUNDA KONNEKSİNLERİN ROLÜ

Böbrekte glomerular filtrasyon oranı TGF mekanizması yolu ile kontrol edilir. Bu karmaşık geribildirim döngüsü için, nefronun özel bir bölgesi JGA'da bulunan afferent arteriyoller ile iletişim halindedir. MDC'ler, tübül lümeninde sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonu artışı ile preglomerular çapın düzenlenmesi için damar daraltıcı sinyalleri gönderir ve böylece nefronun kendi glomerular filtrasyonunda azalma meydana gelir (Briggs ve Schnermann, 1987; Navar ve diğ., 1996). Bu süreç afferent arteriyol düz kas hücrelerine stratejik olarak konumlandırılmış ekstraglomerular mezangial hücreler yoluyla MDC'lerden vazokonstriktör sinyalinin iletimini gerektirir (Moore ve diğ., 1990, Peti-Peterdi ve diğ., 2002; Peti-Peterdi, 2006). JGA hücreleri, makula densa (Bell ve diğ., 2003) hariç olmak üzere vazokonstriktör sinyal iletiminde bir yol oluşturmak için, GJ'ler (Taugner ve diğ., 1984; Goligorsky ve diğ., 1997) üzerinden bağlanır. Nitekim, JGA içerisindeki GJ önemi ve TGF'deki rolleri yakın zamanda, Timus hücre antijeni 1.1 (Thy 1.1) antikoru ile mezangial hücrelerin zarar verdiği ve GJ'lerin heptanol tarafından bozulmasının TGF'nin ortadan kaldırılmasına yol açtığı bir çalışmada sunulmuştur Thy1-1 antikoru taşıyan mezangial hücrelerdeki hasarın ve heptanol ile geçit bağlantılarının yıkılmasına bağlı olarak TGF'nin elimine edilmesine yol açar (Ren ve diğ., 2002).

Ren ve diğ. (2002)'nin yaptığı bir çalışma, TGF'nin mezangial hücreler arasında eşleşmeyi, mezangial hücreler ile düz kas hücreleri arasında hücreler arası bir bağlantıyı veya farklı hücre tipleri arasında sürekli bir bağlantıyı gerektirip gerektirmediğini açıklayamamıştır. Çok sayıda bulgu Cx40'ın JGA'da ana bağlantı proteini olduğunu göstermektedir ancak, TGF'yi belirleyen Cx alt tipleri ile ilgili bilgiler henüz aydınlatılamamıştır (Haefliger ve diğ., 2001; Arensbak ve diğ., 2001; Haefliger ve diğ., 2004; Zhang ve Hill, 2005). Bu araştırmalar, son zamanlarda farelerde Cx40 geninin genetik bozukluğunun artmış interstisyel alanlarda ve ekstraglomerular mezangial hücreleri arasındaki hücreler arası bağlantıların başarısızlığı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Kurtz ve diğ., 2007).

MDC'ler ve mezangial hücreler arasında hiç bir hücre bağlantısı olmadığından, MDC'ler, parakrin sinyallerin serbest bırakılması için bir yol olan Cx hemikanalları aracılığıyla muhtemelen bazolateral membrandan ATP'yi serbest bırakır (Cortina ve diğ., 1998; Yao ve diğ., 2003; Evans ve diğ., 2006). JGA hücrelerinde çok fazla anlatımı yapılan ATP bağlayıcı purinerjik reseptörleri (P2X ya da P2Y) (Inscho, 2001; Schwiebert, 2001; Inscho ve diğ., 2003;

Nishiyama ve diğ., 2004), afferent arteriyollere doğru ekstraglomerular mezangial hücreler yoluyla makula densadan yayılan bir Ca^{+2} akımını tetikler (Peti-Peterdi, 2006). İlginç olarak, alfa-glisirentinik asit ya da heptanol gibi GJ'leri ayıran ajanlar ile GJ'lerin ayrılması hücre içi Ca^{+2} artışını ve Ca^{+2} dalgalarının yayılmasını (Yao ve diğ., 2002) ortadan kaldırır, bu da TGF mekanizmasında hücre bağlantısının rolü olduğunu gösterir. Özetle, TGF sinyaline aracılıkta rol oynayan GJ'lerin birikimine ait kanıtlar olmasına rağmen, ilgili Cx'lerin alt tiplerinde ya da JGA'ya katılan geçit bağlantı yerleşimi hakkındaki detaylı bilgiler hala eksiktir.

2.8. KONNEKSİNLERİN NEFRON BİRLEŞMESİNDEKİ ROLÜ

TGF, glomerular kapillerlerdeki hidrostatik basıncın düzenli salınımlarını kontrol eder. İki komşu glomerülün kılcal basıncı, sıklıkla eş zamanlı olarak salınım yapar (Holstein-Rathlou ve Marsh, 1989; Yip ve diğ., 1992; Wagner ve diğ. 1997). Ayrıca tanımlanmış bir glomerulustaki TGF cevabı deneyi, komşu bir glomerulusta neredeyse eş zamanlı TGF tepkisine neden olur, iki komşu glomerulusun birbiriyle iletişim kurduğu açıktır ki bu olay “nefron birleşmesi” olarak adlandırılır. Bu nefron birleşmesinin yapısal temeli afferent arteriyollerin iki kollu ya da üç kollu uçlarıdır. Nefron birleşme mekanizması, damarsal bir uçtan, dallanan bölgelere karşı sinyal yayılımını, sinyalin diğer dallara ortograd yayılımını içerir (Casellas ve diğ., 1997). Sinyal, özellikle glomerulusun girişindeki afferent arteriyollerin tonusuna etki etmelidir. Sinyal GJ'ler yoluyla, afferent arteriyollerin duvarları boyunca iletilir. Prensip olarak, sinyal iletimi, ayrıca endotel veya düz kas hücre katmanı boyunca meydana gelebilir. Mevcut verilerden, nefron birleşmesini, endotel veya düz kas geçit bağlantılarına ilişkilendirmek henüz mümkün değildir. Cx içermeyen fareler, bu konuya değinme açısından güçlü bir deney modelidir. Örneğin; endotel iletiminin, Cx40'ın eksik olduğu farelerde azalması beklenebilir, oysa ki her bir Cx geninde özgün bozulma olan fareler, düz kas tabakasının orta katmanı boyunca bozulmuş iletim göstermektedir. Yayılan sinyalin yapısı gelecekteki deneylerde büyük olasılıkla karakterize edilecektir. En basit açıklama, zar potansiyelindeki değişimlerin, bir afferent arteriyolden diğerine yayılmasıdır (Wagner ve diğ. 1997).

Afferent arteriyollerin düz kas hücreleri kalsiyum kanalları (Hansen ve diğ., 2001; Jensen ve diğ., 2004) içerdiği için zar potansiyelindeki değişimler, hızlı bir şekilde tonus değişimlerine neden olur. Bu bağlamda Wagner ve diğ. (1997)'leri sıçan böbreklerinde, KCl uygulaması ile belirli bir afferent arteriyölün distal ucunda uyarılan daralmanın kortikal radyal arterde ve komşu afferent arteriyollerde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Bu vazomotor tepkilerin iletimi,

kendiliğinden hipertansif farelerde, çok daha fazladır ki bu hipertansif durumda nefronlar arası birleşmenin güçlendiğini gösterir. Hipertansiyon boyunca artmış Cx40 ve Cx43 anlatımı, damar duvarındaki hücreler arası birleşmeyi gerçekleştirebilir ve bu nedenle kendi kendine hipertansif olan farelerdeki komşu nefronların iletimini yoğunlaştırır. Ancak, bu durum hala belirsizdir ve Cx'lerin hipertansif uyarılma düzeyinin esasen endotel ya da düz kas hücreleri arasındaki bağlantısal iletimi etkileyip etkilemediği araştırılmalıdır.

2.9. RENİN ÜRETİMİNİN VE SALGILANMASININ DÜZENLENMESİNDE KONNEKSİNLER

JGA farklı tipte ve farklı fonksiyona sahip hücreleri içeren yapıdır. JGA'yı oluşturan hücrelerin GJ'ler aracılığıyla güçlü bir ilişkide olduğu bilinmektedir. Morfolojik kanıtlar, renin salgılayan hücrelerin güçlü elektriksel bağlantılarını gösteren fonksiyonel verilerle desteklenmiştir (Bührle ve diğ., 1986; Kurtz ve Penner, 1989; Russ ve diğ., 1999). Renin üreten hücreler ve JGA'nın diğer hücreleri olan endotel veya ekstraglomerular mezangial hücreler arasında da çok sayıda GJ'ler bulunur (Taugner ve diğ., 1978; Taugner ve diğ. 1984).

Bu hücrelerde yüksek yoğunluklu olarak ifade edilen Cx40, renin üreten hücrelerde Cx'lerin baskın izoformudur (Haefliger ve diğ., 2004; Wagner ve diğ., 2007, Barajas ve diğ., 1994). Damar sistemi içinde Cx40'ın anlatımı neredeyse sadece endotelde yapılır. Afferent arteriyollerin distal kısımlarının vaskülerindeki düz kas hücrelerinin yerini aldığı bilinen renin üreten hücreler için, endotel için tipik olan Cx'lerin anlatımının yapılmaması beklenir, ancak spesifik olarak Cx alt tipleri olan Cx43 normalde VSMC'lerde bulunur. İlginç bir şekilde, jukstaglomerular renin üreten hücreler Cx43 (Hwan ve Beyer, 2000; Haefliger ve diğ., 2001, Arensbak ve diğ., 2001) anlatımı yapmazlar. JGA'da hücre bağlamalarının fonksiyonel önemi yaygın bir şekilde çalışılmamıştır, ancak renin sisteminin aktivitesinin kontrolünde mezangial hücreler ya da renin üreten hücrelerdeki Cx40 aracılı bağlantı hipotezi, sinyal yolları için bir fikir sağlamaktadır. Renin sentezi ve salınması özellikle, Ang II seviyesi, damar içindeki hidrostatik basınç gibi klasik negatif geribildirim döngüsü ve makula densadan geçen NaCl konsantrasyonu tarafından kontrol edilir. Son zamanlarda inhibitör sinyal iletiminde Cx40 geçit bağlantılarının rolü, Cx40 içermeyen modellerin kullanıldığı çalışmalarda ele alınmıştır (Krattinger ve diğ., 2007; Wagner ve diğ., 2007). Kan basıncının etkisini araştırmak için klasik yaklaşım, deneysel olarak tek taraflı böbrek atar damarlarının daralmasıdır ki bu durumda salgılanan renin artışı hipoperfüze böbrekte hipertansiyona yol açar ve sağlam böbrekte renin

salgısı azaltılır. Cx40 eksikliği olan farelerde bu işlemi gerçekleştirmek, plazma renin konsantrasyonunda ve kan basıncında bir artışa neden olmaz ve hipoperfüze böbrekte beklenen renin salgısında artışı desteklemez (Krattinger ve diğ., 2007; Wagner ve diğ., 2007). Renin sistemi üzerinde Ang II'nin baskılayıcı etkisinin araştırılması benzer sonuçlara yol açmıştır. Bu, ACE inhibisyonun kaynaklanan dolaşımdaki azalmış Ang II seviyesinin Cx40^{-/-} farelerde renin sentezinin ve salgılanmasının açık bir şekilde azalmasına yol açtığı *in vivo* deneylerde gösterilmiştir (Krattinger ve diğ., 2007; Wagner ve diğ., 2007). Son olarak, Cx40 eksikliğinde renin üreten hücrelerin makula densa sinyalini baskılamayı kestiği gösterilmiştir. Böylece, yabanil tip farelerde loop diüretikleri uygulanması normal şekilde renin sisteminin aktivitesini uyarır, oysa bu uyarıcı etki Cx40 içermeyen farelerde belirgin bir şekilde zayıflatılır (Kurtz ve diğ., 2007). Bu bulgular, böbrek içi kan basıncı, Ang II veya tuz yüklemesini içeren klasik geri bildirim döngülerinin renin üreten hücrelerin sıralı baskılayıcı sinyallerin hücreden hücreye taşınmasına dayandığını işaret ederek, Cx40 yokluğunda yetersiz olduğunu göstermektedir (Kurtz ve diğ., 2007).

Afferent arteriyollerin (Krattinger ve diğ., 2007; Zhang ve Hill, 2005; Barajas ve diğ., 1994; Haefliger ve diğ., 2001; Arensbak ve diğ., 2001) VSMC ve EC'lerinde normal olarak anlatımı yapılan ama renin üreten hücrelerde bulunmayan Cx43 ile Cx32 yer değiştirdiğinde, hipertansiyon ve renin salınması belirgin olarak azalır (Haefliger ve diğ., 2006). Bu bulgular hücreler arası iletişimin, renin üreten hücreler tarafından anlatımı yapılan Cx40 ve endotel hücrelerinde bulunan Cx43 aracılığıyla olduğunu ve renin sisteminin kontrolü için gerektiğini göstermiştir. Cx40 ve Cx43 genlerindeki bozuklukların renin sisteminin aktivitesinde nasıl karakteristik değişiklikler yapabileceği henüz bilinmemekte ve daha fazla araştırılması gerekmektedir. Cx43'ün yer değiştirmesi ya da Cx40'ın silinmesi ile renin sisteminin kontrolünde üst üste görülen hataların, Cx40 ve Cx43 sinyal mekanizmasının fonksiyonel bir bağlantı desteği vereceği görülür. Bu iki izoformun, heterotipik kanallar (Rackauskas ve diğ., 2007) oluşturmak için uygun olmadığı görülür. Bu durum, JGA'da yer alan hücrelerin bulunduğu çevre yüzünden olduğu düşünülebilir. Parakrin sinyal ile humoral faktörlerin iletimi renin sisteminin kontrolünde belli bir rol oynayabilir.

Hipertansiyonun patogenezi ile ilgili çalışmalarda, böbrekteki Cx'lerin modifikasyonları daha ayrıntılı olarak tarif edilmiştir. Moleküler biyoloji çalışmalarında, deneysel olarak indüklenen yüksek kan basıncı, böbreklerde Cx40 mRNA'sında ve proteininde bir artışa yol açarken, Cx43

sadece klipslenmemiş böbrekte artmıştır. İmmünohistokimyasal analiz, Cx40 proteininin yükselmesinin, afferent arteriyollerin duvarındaki renin üreten hücrelerde artan anlatımından kaynaklandığını göstermiştir Benzer şekilde, Cx43 anlatımı aort duvarındaki hipertansiyondan da etkilenir. Anlaşılan, vasküler hücreler arasında hücreden hücreye yapılan iletişim, normal vasküler fonksiyonun düzenlenmesini bozmakta, örneğin, diyabetik nefropati veya hipertansiyonun patogenezi için potansiyel moleküler hedefler oldukları sonucuna varılabilir.

2.10.ASKORBİK ASİT

C vitamini (askorbik asit) ilk olarak 1920'lerde tanımlanmıştır, deneysel çalışma olmadan önce dahi birçok hastalığın tedavisi için önerilmiş ve uygulanmıştır (Kuhn ve diğ., 2018). AA, moleküler kütlesi 176.1 dalton olan heksonik ve suda çözünen bir şeker asididir. Bitkilerde ve hayvanlarda önemli bir antioksidan ve enzim kofaktörü olmasına rağmen, insanlar ve diğer bazı türler, AA oluşturamazlar ve dışarıdan diyet yolu ile almak zorundadırlar (Mandl ve diğ., 2009). Oksidoredüktazların canlı organizma ve çevresi arasındaki enerji alışverişindeki rolleri iyi bilinmektedir. Genel olarak AA, bir indirgeyici madde olarak kabul edilir. Serbest radikal aracılı oksidasyon işlemlerinde bir antioksidan olarak rol oynar. Bununla birlikte, bir indirgeyici madde olarak da bakır ve demir gibi redoks-aktif metallerin azaltılması, bu metallerin pro-oksidan kimyasının artırılmasında iş görür. AA, hem oksidan hem de antioksidan olarak hareket edebilir (Buettner ve Jurkiewicz, 1996).

İnsanların, AA sentezinde son enzimatik basamağı katalize eden glukonolakton oksidaz enziminin yokluğu nedeniyle üretememesine rağmen, redoks, metabolik ve düzenleyici yönlerini anlamak için birçok çalışma yapılmıştır.

AA, hayvanlarda Uridin difosfat (UDP)-glukuronattan başlayan üronik yol boyunca oluşur. Dolayısıyla sentezi, karbonhidrat metabolizmasının ayrılmaz bir parçası olarak düşünülebilir. UDP-glikoz'un karşılanması, karbonhidrat depolarına bağlı olduğu gösterilmiştir (Bánhegyi, 1988; Bánhegyi ve Mandl, 2001).

Endotoksemi patofizyolojisinde, endotel hasarı düzensiz bir inflamatuvar cevap olarak sitokinlerin salınımı ve doku yaralanması, patofizyolojik kökenlerinden birini teşkil eder (Biesalski ve McGregor, 2007; İnce ve diğ., 2016). Bir sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

olan oksidatif stres, endotoksemide meydana gelir. Hipoksi, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve ATP'nin tükenmesi, kardiyomiyopati, çoklu organ bozukluğu ve hipotansiyon gibi tipik semptomlara katkıda bulunan mikro sirkülasyonu doğrudan etkiler. Geçen yüzyılın başından bu yana kritik hastalarda koruyucu antioksidanlar ve özellikle AA seviyelerinin düşük olduğu bilinmektedir (Gabbe, 1934; Syed ve diğ., 2014). Oksidatif stres arttığında endotoksemide, AA ve tiamin tüketimi arttıkça, potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak antioksidan uygulanan tedavi önerilmektedir. AA, tiamin ve hidrokortizon verilip verilmemesi endotoksemi tedavisinde hala tartışılmaktadır (Carr ve diğ., 2015; Marik ve diğ., 2017). Damar yolu ile AA uygulaması septik hastalarda mikro-vasküler fonksiyonu iyileştirebilir (Wilson, 2009). Endotel hücre proliferasyonuna ve apoptoza katkısı, düz kas aracılı vazodilatasyona ve endotel bariyer geçirgenliğine etkisi, AA septik şoktaki patofizyolojik değişikliklerin tedavisinde önemli bir ajan olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, AA bakteriyostatik aktiviteye de sahiptir (Mandl ve diğ., 2009).

Deneysel endotoksemi modellerinde, damar içine AA uygulaması organ yaralanmasını azaltır ve sağ kalımı artırır (Wilson, 2009; Fisher ve diğ., 2011; Fisher ve diğ., 2012; May ve Harrison, 2013; Wilson, 2013; Fisher ve diğ., 2014; Oudemans-van Straaten ve diğ., 2014). Ek olarak, ortaya çıkan kanıtlar, AA'nın, kortikosteroidler ve tiamin kombinasyonunun, endotoksemi kaynaklı organ fonksiyon bozukluklarını tersine çevirmede sinerjik etkili olabileceğini göstermektedir (Marik, 2018).

Sonuç olarak, LPS uygulamasıyla oluşturulan endotoksemi hipotansiyona, organlardaki kan akımının azalmasına ve dokularda hasarlara neden olmaktadır. Bu durumda, özellikle kan basıncının ayarlanması bireyin hayatta kalması için önemli bir durumdur. LPS nedenli hipotansiyonun düzenlenmesinde jukstaglomerular hücrelerden renin salınımının gerçekleştiği ve bu salınımda geçit bağlantılarının oluşumunda görevli Cx proteinlerinin rolü olduğu bilinmektedir. Renin salınımına bağlı olarak Ang II seviyesinde artış meydana gelirken bu durum oksidatif stresin de artmasına neden olmaktadır.

Endotoksemi ve etkileri ile ilgili, Cx'lerin renin salınımı ile ilgili ayrı ayrı çalışmalar olsa da, endotoksemide GJ'lerde bulunan Cx proteinlerinin RAS ile arasındaki ilişki hakkında çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu bilgiler neticesinde, Gram (-) bakteri endotoksini olan LPS uygulanarak oluşturulan endotoksemik sıçanlarda RAS ile ilişkili GJ'lerde bulunan Cx proteinlerinin dağılımı ve etkileri üzerine AA'nın rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI

Deneyleerde, yetişkin 2-3 aylık 30 adet erkek *Wistar Albino* sıçan (250-300 g) kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan hayvanlar, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı. Çalışma için, İ.Ü. Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Tarih: 06.03.2014, Sayı: 2014/43). Deneyleerde kullanılacak hayvanlar, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Laboratuvar Hayvanı Üretim Bölümü'nden deneyleerin yapılacağı gün alındı.

3.2. DENEY DÜZENEĞİ VE CERRAHİ İŞLEMLER

Sıçanlar, 50 mg/kg ketalar (Pfizer Limited), 0.25 mg/kg medetomidin (Domitor; Orion Pharma) ve 0.05 mg/kg atropin sülfat (Drogsan) karışımının intraperitoneal (ip) olarak uygulanmasıyla anestezi altına alındı. Anestezi altındaki hayvanlar, ısıtma tablasına yerleştirildi ve vücut sıcaklıkları rektal prob aracılığıyla (ADInstruments) sürekli ölçülerek kontrol altında tutuldu. Vücut sıcaklığının deney boyunca $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de olması sağlandı. Trakeye kanül yerleştirerek, hayvanların ventilatör (Model 683, Harvard Apparatus Inc., Rodent) aracılığıyla mekanik olarak soluk almaları sağlandı. Deneylee süresince hayvanların ortalama arteriyal kan basınç (OAB) ve kalp vuruumu gibi hemodinamik parametrelerin ölçümü için sağ karotid artere, kan örnekleri almak için sağ femoral artere, anestezi infüzyonu için sağ jugular vene ve madde uygulaması için sağ femoral vene polietilen kanül (0.9 mm çapında: Braun, Melsunger, Germany) takıldı (Legrand ve diğ., 2011). OAB ve kalp vuruumunu, sağ karotid artere takılan kanüle bağlı bir basınç transdüser (MLT1199, ADInstruments) aracılığıyla veri aktarım ünitesinde (PowerLab 8/30, ADInstruments, Sidney, AUS) kayıt altına alındı. Deneylee boyunca Ringer laktat (Eczacıbaşı-Baxter, İstanbul, Turkey) ile ketamin karışımı (1:9) 10 ml/kg/sa hızla perfüzyon pompası aracılığı ile (KDS 200, KD Scientific) sağ jugular venden verildi ve her kan alınımından sonra voluven (1 ml Voluven® HES 130/0.4, Fresenius Kabı, Germany) infüzyonu yapıldı. Yaklaşık 1.5 saat süren cerrahi işlemlerden sonra operasyon alanları nemlendirilmiş gazlı bez ile kompanse edildi, dokunun ve alanların kuruması engellendi ve stabilizasyon için deneylee başlangıcından önce 30 dakika beklendi.

3.3. DENEY PROTOKOLÜ

Çalışmada kullanılacak hayvanlar rastgele bir şekilde 4 gruba ayrıldı.

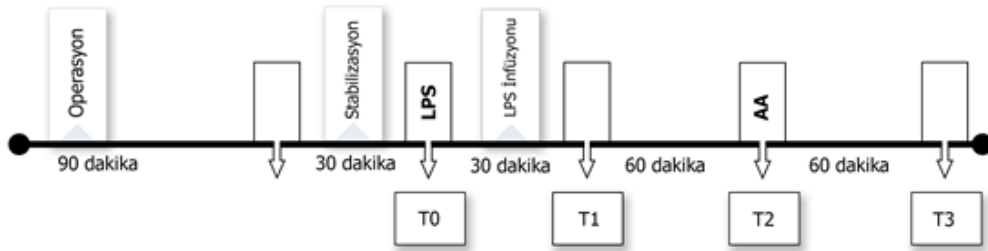
Kontrol grubu (n=6): Sadece operasyonun yapıldığı grup; deney başlangıcından itibaren 30 dakika boyunca infüzyon yoluyla 1ml serum fizyolojik suyun verildiği infüzyondan 1 saat sonra 1-2 dakika içinde 1ml serum fizyolojik suyun verildiği grup;

LPS grubu (n=8): LPS (2 mg/kg, *E. coli* serotype 0127:B8, Sigma)'nin deney başlangıcından itibaren 30 dakika boyunca infüzyon pompasıyla iv olarak verildiği ve LPS infüzyonundan 1 saat sonra 1ml serum fizyolojik suyun 1-2 dakika içinde iv olarak verildiği grup;

LPS + AA grubu (n=8): LPS (2 mg/kg, *E. coli* serotype 0127:B8, Sigma)'nin deney başlangıcından itibaren 30 dakika boyunca infüzyon pompasıyla iv olarak verildiği ve LPS infüzyonundan 1 saat sonra 100 mg/kg AA'nın 1-2 dakika içinde iv olarak verildiği endotoksemi grubu;

AA grubu (n=8): Deney başlangıcından itibaren 30 dakika boyunca 1ml serum fizyolojik suyun infüzyon pompasıyla iv olarak verildiği ve infüzyondan 1 saat sonra 100 mg/kg AA'nın 1-2 dakika içinde iv olarak verildiği grup.

Deney başlangıcından itibaren 2.5 saat boyunca, LPS uygulanmadan önce (T0, deney başlangıcında), LPS infüzyonunun sonunda (T1), LPS infüzyonu bittikten 1 saat (T2) ve 2 saat sonra (T3, deney sonunda) olmak üzere 4 farklı zaman noktalarında kan parametrelerinin analizleri için sağ femoral arterden kan örnekleri alındı. Ayrıca, deney sonunda biyokimyasal ve immünohistokimyasal analizler için böbrek ve kan örnekleri alındı (Şekil 3.3.1).



Şekil 3.3.1: Deneysel çalışmada uygulanan işlemlerinin şematik olarak gösterilmesi.

3.4. KAN PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ

Deney hayvanlarının T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarında alınan kan örneklerinde, pH, $c\text{HCO}_3^-$ (P,st) (Standart bikarbonat; $p\text{CO}_2$ değeri 40 mmHg olan tam oksijenlenmiş 37°C 'deki kanda plazma bikarbonat düzeyi)], baz fazlalığı $c\text{Base}$ (Ecf) (standart baz fazlalığı, baz açığının *in vivo* ifadesi), $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, $c\text{Na}^+$, $c\text{Cl}^-$, $c\text{Glu}$ (Plazmadaki D-glikoz konsantrasyonu), $c\text{Lac}$ (Plazmadaki L-Laktat konsantrasyonu) değerleri kan gazı analizatörü (ABL90 Flex kan gazı analizatörü, Radiometer, Danimarka) ile ölçüldü.

3.5. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

3.5.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması

Deney sonunda alınan kan örnekleri $+4^\circ\text{C}$ 'de, $4000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildikten (Mikro 220R, Hettich, Germany) sonra elde edilen plazma örnekleri biyokimyasal analiz yapılana kadar -20°C 'de saklandı.

3.5.2. Doku Homojenizasyonu

Deney sonunda hayvanlardan alınan böbrek dokuları sıvı azotta dondurulduktan sonra -20°C 'de saklandı. Tüm gruplara ait total böbrek örnekleri yaş olarak tartıldıktan sonra 1/10 (w/v) oranında sulandırılarak soğuk fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, 0.02 mol/L, pH 7.4) içerisinde buz üzerinde hızla parçalanarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar ependorflara aktararak soğutmalı santrifüjde $+4^\circ\text{C}$ 'de $12000 \times g$ 'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant ve pelet olmak üzere 2 farklı fraksiyon elde edildi. Elde edilen süpernatantlar, biyokimyasal ölçümler yapılana kadar -20°C 'de saklandı. Tüm plazma ve homojenat örneklerinde renin, Ang II, Cx40 ve Cx43 seviyeleri Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi kullanılarak ölçüldü.

3.5.3. Doku Homojenatlarında ve Plazma Örneklerinde Konneksin 40, Konneksin 43, Renin ve Anjiyotensin II Düzeylerinin Belirlenmesi

ELISA yöntemiyle çalışan ticari olarak temin edilen sıçan Cx43 (Eastbiopharm Co., Hangzhou, China, Cat. No: CK-E30032), sıçan Cx40 (Eastbiopharm Co., Hangzhou, China Cat. No: CK-E30375), sıçan Renin (Eastbiopharm Co., Hangzhou, China Cat. No: CK-E91556), sıçan Anjiyotensin II (Eastbiopharm Co., Hangzhou, China Cat. No: CK-E91555) kitleri içerisindeki

96 kuyucuklu ve her bir moleküle özgül antikor ile kaplanmış mikropalaklar kullanıldı. Deney prosedürü sonunda sonuçlar Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA marka plak okuyucuda ölçüldü. Kitlerin çalışılması esnasında aşağıdaki ortak prosedür sırasıyla uygulandı.

- Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kitler oda sıcaklığına getirildi. Altı adet standart; kitin içerisinde bulunan 0.5 ml'lik stok standartların seri dilüsyonu ile elde edildi.
- Antikor ile kaplı mikropalak kuyucuklarına hazırlanan standartlardan 50 µl eklendi. Ardından standartların üzerlerine 50 µl streptavidin-yaban turpu peroksidaz (HRP; Horseradish Peroxidaz) pipetlendi.
- Standartlar mikropalağa konulduktan sonra, sırasıyla örnekler (plazma ve doku homojenatları) her bir kuyucuğa 40 µl olacak şekilde ilave edildi.
- Örneklerin üzerlerine sırasıyla 10 µl antikor ve 50 µl Streptavidin-HRP konuldu.
- Mikropalağın üzeri kapatılarak 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Kit içerisinde bulunan 30x'lik yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra, ELISA plate yıkayıcıda 350 µl'de 5 kez yıkandı.
- Tüm kuyucuklara sırasıyla 50 µl A kromojen solüsyonu ve B kromojen solüsyonu damlatıldı.
- 10 dakika 37°C'de ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakıldı.
- Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Sarı renk değişimi gözlemlendi.
- Mikropalak 10 dakika içerisinde 450 nm absorbanda okundu.

3.6. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Işık mikroskobu için yapılan çalışmalarda, deney hayvanlarından alınan dokular % 10'luk nötral tamponlu formaldehitte tespit edildikten sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek ksilolde saydamlaştıktan sonra parafine (58°C'lik) gömüldü. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında alınan kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirildi. Antijen

iyileştirilmesi için kesitler, sitrat tamponu (pH 6.0) (Lab Vision AP-9003-500) içerisinde mikrodalgada 10 dakika tutulduktan sonra, 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Endojen peroksidaz aktivitesi, % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂)'de 10 dakika oda sıcaklığında tutularak bloklandıktan sonra distile suyla çalkalanıp PBS'e (pH 7.2) alındı. Daha sonra oda sıcaklığında nemli ortamda 10-15 dakika Ultra V blok (Lab vision, TA-125-UB) uygulandı. Bu kesitlerde, Anti-Connexin 40 / GJA5 (Abcam, ab101929) antikorunu uygulaması +4°C'de bir saat bekletilerek yapıldı. Antikorlar, UltrAb Diluent (Lab vision, TA-125-UD)'da 1:250 oranında sulandırıldı. Kesitler, PBS'de 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra, 30 dakika oda sıcaklığında, keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikorunu (Lab vision, TR-060-BN) ile inkübe edildi. Kesitler PBS'de yıkandıktan sonra, peroksidaz ile işaretli streptavidin (Lab vision, TS-060-HR)'de oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için 5 dakika AEC (3-amino-9-etilkarbazol) (Lab vision, TA-004-HAC) ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkanıp, Mayer hematoksilen (LabVision, TA-125-MH) ile zıt boyama yapıldı ve gliserol jelatin (LabVision, TA-125-UG) ile kapatıldı. Her grubun bireylerinden rastgele belirli sayıda alanlarda reaksiyonlar yoğunluğuna ve dağılımına göre derecelendirildi. Yoğunluğuna göre; 0 (boyanmamış), 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (yoğun) şeklinde skorlandı. Ayrıca bu reaksiyonlarının görüntü alanındaki dağılımları 100 üzerinden değerlendirildi. Her bir grup için HSCORE = S.Pi (i + 1) formülü kullanılarak belirlendi. "i" yoğunluk skoru, "Pi" alandaki boyanmış hücrelerin yüzdesini göstermektedir (Legrand ve diğ., 2011). Kameram 390 CU (Mikrosistem Ltd. Türkiye) sistemi aracılığı ile kesitlerden fotoğraflar çekildi.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Elde edilen veriler, Instat İstatistiksel Paket Programı (Instat Graphpad Software, San Diego, CA, USA.) aracılığı ile analiz edildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. Grupların dağılımının, normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben biyokimyasal, immünohistokimyasal ve hemodinamik veriler (grup içi T0 noktasına göre karşılaştırmalar için) tek yönlü varyans analizi uygulanarak Tukey'in çoklu karşılaştırma testi (Tukey's Multiple Comparison Test) ile hemodinamik ve kan gazı verileri (gruplar arasında T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarına göre) çift yönlü varyans analizi uygulanarak Benforroni'nin çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

4. BULGULAR

4.1. HEMODİNAMİK BULGULAR

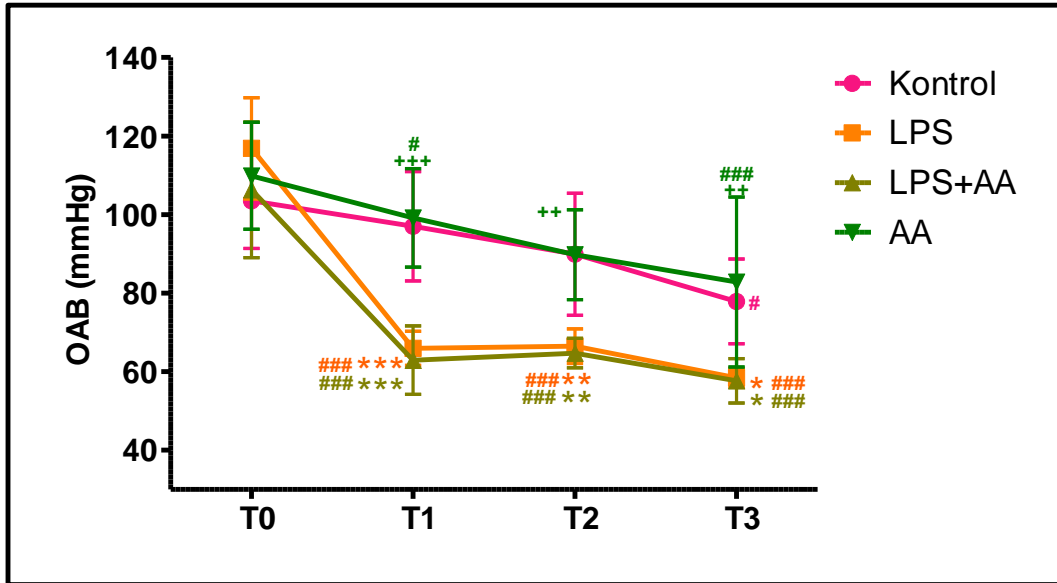
Sağ karotid artere takılan kanül ve buna bağlı olan fizyolojik basınç transdüseri aracılığı ile OAB ve kalp vurumu PowerLab 8/30 veri kazanım ünitesi (ADInstruments) yardımı ile kayıt altına alındı (Şekil 4.1.1). Elde edilen kayıtlar, LabChart8 (ADInstruments) programında incelendi ve istatistiksel analizleri yapıldı.



Şekil 4.1.1: *In vivo* kayıt sisteminde kaydedilen hemodinamik parametreler; ortalama arteriyel basınç (mmHg) ve kalp vurumu (vurum/dakika).

4.1.1. Ortalama Arteriyel Basınç (OAB) Değerleri

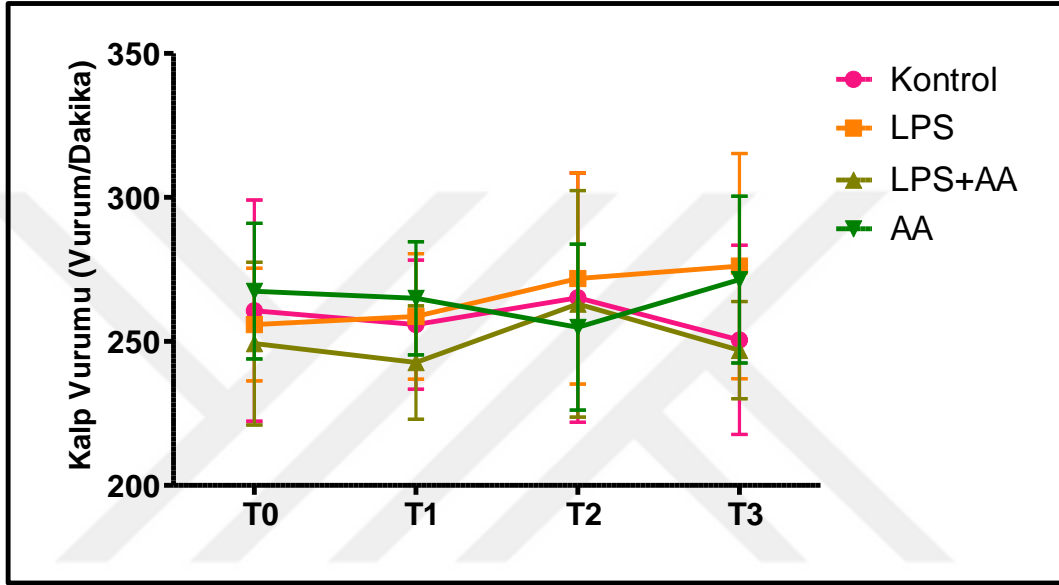
Deney gruplarına ait OAB verileri kontrole ve başlangıç değerleri olan T0 zaman noktasına göre istatistiksel olarak değerlendirildi. Deney gruplarına ait tüm T0 zaman noktasına ait başlangıç değerlerinin benzer olduğu ve farklılık göstermediği tespit edildi. Kontrol grubu verileri T0 zaman noktasına göre karşılaştırıldığında sadece T3 zaman noktasında OAB'nin azaldığı ($p<0.05$) belirlendi. LPS grubunda OAB'nin T1 ($p<0.001$), T2 ($p<0.01$) ve T3 ($p<0.05$) zaman noktalarında kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Ayrıca, bu grupta OAB'nin T0 başlangıç değerine göre T1 ($p<0.001$), T2 ($p<0.001$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında da azaldığı tespit edildi. LPS uygulamasından sonra AA uygulanan LPS+AA grubunda OAB'nin, T1 ($p<0.001$), T2 ($p<0.01$) ve T3 ($p<0.05$) zaman noktalarında kontrol grubuna göre azaldığı ve LPS grubuna benzer olduğu belirlendi. Ayrıca OAB'nin T0 başlangıç noktasına göre T1 ($p<0.001$), T2 ($p<0.001$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında da azalmış olduğu tespit edildi. Sadece askorbik asit verilen AA grubunda OAB'nin kontrole benzer olduğu, LPS grubuna göre ise T1 ($p<0.001$), T2 ($p<0.01$) ve T3 ($p<0.01$) zaman noktalarında yüksek olduğu görüldü. T0 noktasına göre ise T1 ($p<0.05$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarından azalmanın olduğu, T2 noktasında ise azalmanın anlamlı bir düzeyde olmadığı tespit edildi (Şekil 4.1.1.1).



Şekil 4.1.1.1: Deney gruplarına ait ortalama arteriyel basınç (OAB) değerlerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$, LPS grubuna göre; # $p<0.05$, ### $p<0.001$, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.

4.1.2. Kalp Vurumu Değerleri

Deney gruplarına ait kalp vurumu verileri kontrole ve başlangıç değerleri olan T0 zaman noktasına göre istatistiksel olarak değerlendirildi. Deney gruplarına ait tüm T0 zaman noktasına ait başlangıç değerlerinin benzer olduğu ve farklılık göstermediği tespit edildi. Bütün zaman noktalarında gruplar arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.1.2.1).



Şekil 4.1.2.1: Deney gruplarına ait kalp vurumu değerlerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri.

4.2. KAN PARAMETRELERİNİN BULGULARI

Deney gruplarına ait hayvanların femoral arterlerinden T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarında alınan kan örneklerinde pH, bikarbonat [$c\text{HCO}_3^-$ (P.st)_c], baz fazlalığı [$c\text{Base}$ (Ecf)], $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, $c\text{Na}^+$ ve $c\text{Cl}^-$ düzeyleri ile metabolit paramerelerden glikoz [$c\text{Glu}$] ve laktat [$c\text{Lac}$]düzeyleri belirlendi.

pH değerlerinin LPS uygulanmasıyla kontrol grubuna göre T1, T2 ve T3 zaman noktalarında azaldığı görülsede anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. LPS+AA grubunda kontrol grubuna göre T2 ($p<0.05$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktasında azaldığı görüldü. Aynı zamanda AA grubunda LPS grubuna göre T3 ($p<0.01$) zaman noktasında yüksek olduğu belirlendi. T0 başlangıç noktasına göre LPS grubunda T2 ($p<0.05$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında, LPS+AA grubunda ise T3 ($p<0.01$) noktasında azaldığı tespit edildi (Tablo 4.2.1, Şekil. 4.2.1).

$c\text{HCO}_3^-$ (P,st)_c (mmol/L) değerlerinin, LPS uygulanmasıyla T3 ($p<0.05$) zaman noktasında kontrole göre azaldığı tespit edildi. LPS+AA grubunda kontrol grubuna göre T1 ($p<0.05$), T2 ($p<0.001$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında azaldığı tespit edildi. LPS grubuna göre AA grubunda T1 ($p<0.01$), T2 ($p<0.05$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca LPS grubunda T3 ($p<0.01$) noktasında, LPS+AA grubunda T1 ($p<0.01$), T2 ($p<0.001$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında T0 başlangıç noktasına göre azaldığı tespit edildi (Tablo 4.2.1, Şekil. 4.2.2).

Baz fazlalığı ($c\text{Base}$ (Ecf)_c) değerlerinin, LPS uygulanan grupta kontrole göre T3 ($p<0.05$) noktasında azaldığı tespit edildi. LPS+AA grubunda kontrol grubuna göre T2 ($p<0.01$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında azaldığı görüldü. Yine LPS+AA grubunda LPS grubuna göre T3 ($p<0.01$) zaman noktasında azaldığı görüldü. LPS grubuna göre AA grubunda T1 ($p<0.01$), T2 ($p<0.05$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında arttığı yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca LPS grubunda T3 ($p<0.01$) noktasında, LPS+AA grubunda T1 ($p<0.05$), T2 ($p<0.001$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında T0 başlangıç noktasına göre azaldığı tespit edildi (Tablo 4.2.1, Şekil. 4.2.3).

$p\text{CO}_2$ değerlerinin LPS grubunda kontrol grubuna göre T0 ($p<0.05$) zaman noktasında azaldığı, T1, T2 ve T3 noktalarında düşük olmasıyla birlikte anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. LPS+AA grubunda LPS grubuna göre T0 ($p<0.01$) ve T3 ($p<0.01$) zaman noktalarında arttığı tespit edildi. AA grubunda ise kontrole ve LPS grubuna göre anlamlı bir değişiklik görülmedi.

Ayrıca T0 değerlerine göre deney gruplarında T1, T2 ve T3 zaman noktalarında anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Tablo 4.2.1, Şekil. 4.2.4).

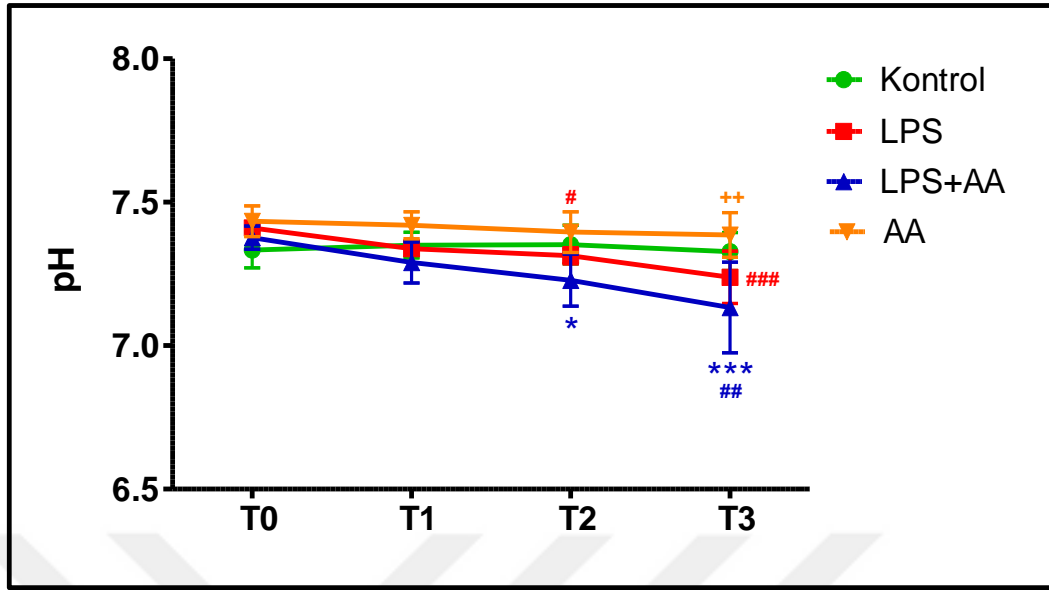
pO₂ değerlerinde kontrol ve LPS grubuna göre diğer gruplarda anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Ayrıca T0 başlangıç noktasına göre deney gruplarında T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerlerde anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Tablo 4.2.1, Şekil. 4.2.5).

cNa⁺ değerlerinde LPS grubunda kontrol grubuna göre T1 (p<0.001) ve T2 (p<0.001) zaman noktalarında azaldığı tespit edildi. LPS+AA grubunda kontrol grubuna göre T1 (p<0.01) zaman noktasında cNa⁺ değerinin azaldığı, LPS grubuna göre ise T2 (p<0.001) zaman noktasında arttığı görüldü. AA grubunda ise LPS grubuna göre T1 (p<0.01) ve T2 (p<0.01) zaman noktalarında yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca LPS grubunda T0 başlangıç noktasına göre T3 (p<0.001) noktasında, LPS+AA grubunda T2 (p<0.05), T3 (p<0.01) noktalarında ve AA grubunda T2 (p<0.05) noktasında arttığı tespit edildi (Tablo 4.2.1, Şekil. 4.2.6).

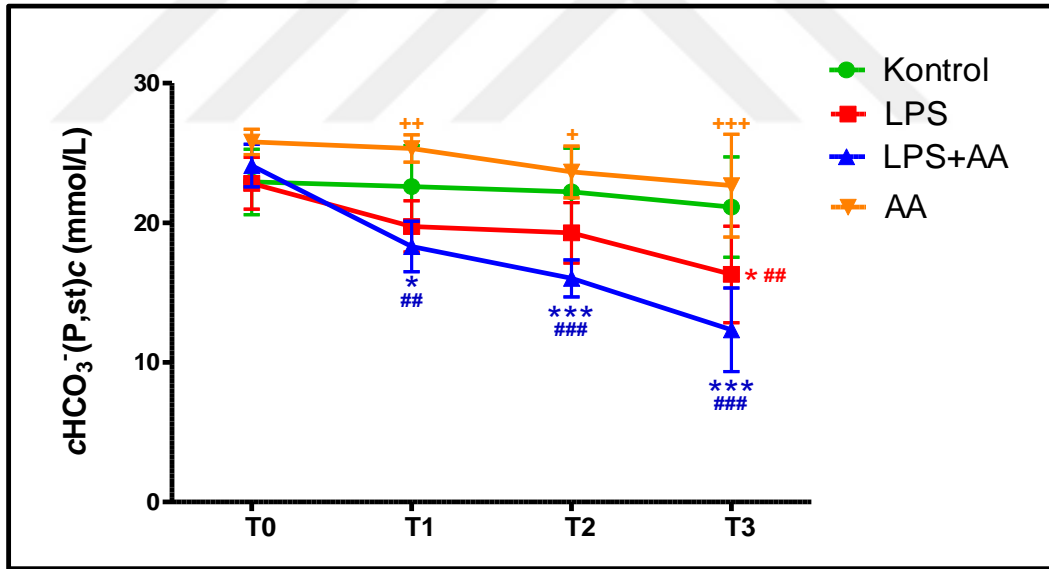
cCl⁻ değerlerinde LPS+AA grubunda kontrol grubuna göre sadece T3 (p<0.05) noktasında arttığı görüldü. Diğer gruplarda ve tüm zaman noktalarında kontrol ve LPS grubuna göre anlamlı başka bir değişiklik tespit edilmedi. Ayrıca kontrol grubunda T1 (p<0.05), T2 (p<0.01) ve T3 (p<0.01) zaman noktalarında, LPS grubunda T3 (p<0.001) noktasında, LPS+AA grubunda T2 (p<0.01) ve T3 (p<0.001) zaman noktalarında, AA grubunda ise T3 (p<0.01) noktasında T0 başlangıç noktasına göre arttığı tespit edildi (Tablo 4.2.1, Şekil. 4.2.7).

Tablo 4.2.1: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde baz fazlalığı [*c*Base (Ecf)], bikarbonat [*c*HCO₃⁻(P.st)*c*], pH, pCO₂, pO₂, *c*Na⁺, *c*Cl⁻ düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, Kontrol grubuna göre; +*p*<0.05, ++*p*<0.01, +++*p*<0.001, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

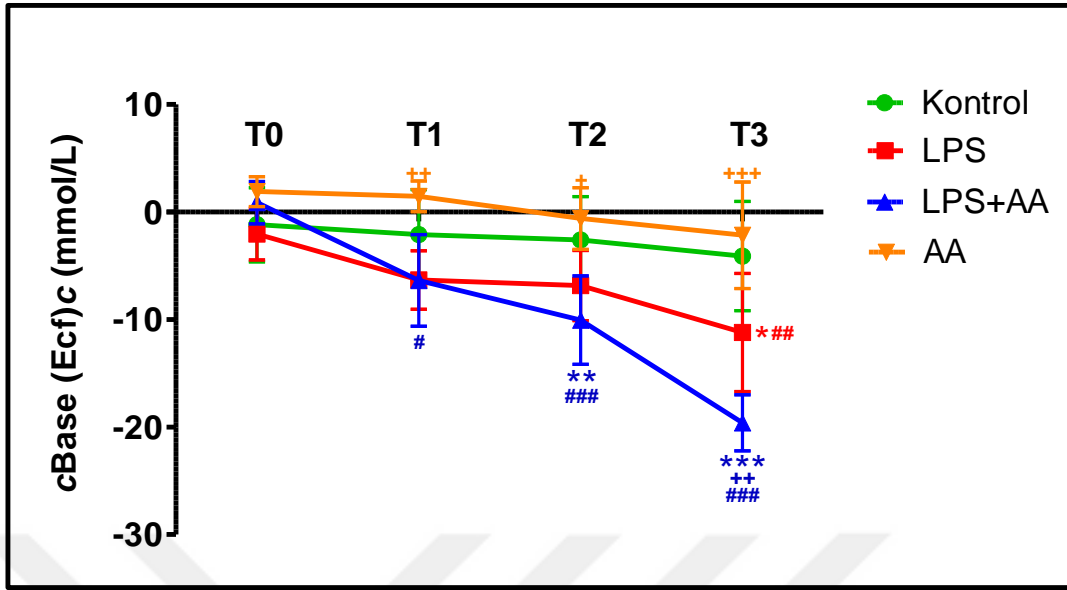
		KONTROL	LPS	LPS + AA	AA
pH	T0	7.334 ± 0.063	7.410 ± 0.014	7.376 ± 0.04	7.434 ± 0.054
	T1	7.351 ± 0.045	7.338 ± 0.028	7.290 ± 0.071	7.420 ± 0.047
	T2	7.352 ± 0.067	7.314 ± 0.028	7.228 ± 0.092*	7.396 ± 0.071
	T3	7.328 ± 0.066	7.238 ± 0.091	7.133 ± 0.159***	7.386 ± 0.078 ⁺⁺
<i>c</i> HCO ₃ ⁻ (P,st) <i>c</i> (mmol/L)	T0	22.926 ± 2.345	22.826 ± 1.59	24.10 ± 1.522	25.800 ± 0.903
	T1	22.600 ± 2.927	19.740 ± 1.830	18.300 ± 1.812*	25.320 ± 0.981 ⁺⁺
	T2	22.226 ± 3.116	19.280 ± 2.161	16.020 ± 1.327***	23.640 ± 1.861 ⁺
	T3	21.126 ± 3.602	16.300 ± 3.448*	12.340 ± 2.992***	22.660 ± 3.683 ⁺⁺⁺
<i>c</i> Base (Ecf) <i>c</i>	T0	-1.176 ± 3.448	-2.050 ± 2.417	0.880 ± 1.966	1.900 ± 1.402
	T1	-2.100 ± 4.179	-6.320 ± 2.723	-6.360 ± 4.261	1.460 ± 1.438 ⁺⁺
	T2	-2.600 ± 4.044	-6.840 ± 3.268	-10.040 ± 4.114**	-0.600 ± 2.875 ⁺
	T3	-4.100 ± 5.081	-11.200 ± 5.486*	-19.600 ± 2.614 ^{***++}	-2.160 ± 4.960 ⁺⁺⁺
pCO ₂ (mmHg)	T0	46.180 ± 10.716	36.360 ± 2.868*	49.920 ± 5.535 ⁺⁺	41.314 ± 6.084
	T1	41.330 ± 3.786	36.140 ± 2.745	43.900 ± 4.794	41.400 ± 5.360
	T2	40.790 ± 2.541	37.960 ± 4.684	44.220 ± 4.907	41.720 ± 11.031
	T3	40.870 ± 2.646	37.126 ± 4.013	50.460 ± 8.626 ⁺⁺	37.260 ± 4.806
pO ₂ (mmHg)	T0	73.775 ± 14.923	91.560 ± 14.785	77.940 ± 11.173	87.060 ± 15.915
	T1	78.675 ± 10.070	92.260 ± 9.162	86.080 ± 12.898	82.180 ± 13.298
	T2	79.700 ± 12.747	92.760 ± 11.398	86.080 ± 12.400	78.280 ± 16.414
	T3	80.800 ± 15.414	86.830 ± 17.859	83.400 ± 17.350	79.400 ± 20.798
<i>c</i> Na ⁺ (mmol/L)	T0	142.250 ± 1.299	139.600 ± 1.342	140.400 ± 2.302	141.080 ± 1.238
	T1	144.600 ± 2.510	138.000 ± 1.871 ^{***}	140.000 ± 2.739 ^{**}	142.400 ± 1.517 ⁺⁺
	T2	145.334 ± 2.321	140.000 ± 1.581 ^{***}	145.200 ± 2.588 ⁺⁺⁺	144.000 ± 1.581 ⁺⁺
	T3	144.734 ± 1.090	145.250 ± 1.920	146.600 ± 1.517	143.400 ± 1.949
<i>c</i> Cl ⁻ (mmol/L)	T0	110.000 ± 1.225	109.000 ± 1.871	109.000 ± 1.871	109.720 ± 2.862
	T1	113.250 ± 1.920	109.800 ± 1.924	112.200 ± 3.033	111.200 ± 1.789
	T2	114.500 ± 0.500	113.400 ± 2.510	117.000 ± 3.317	113.400 ± 1.517
	T3	114.500 ± 2.062	117.500 ± 3.640	118.800 ± 2.387*	116.600 ± 4.39



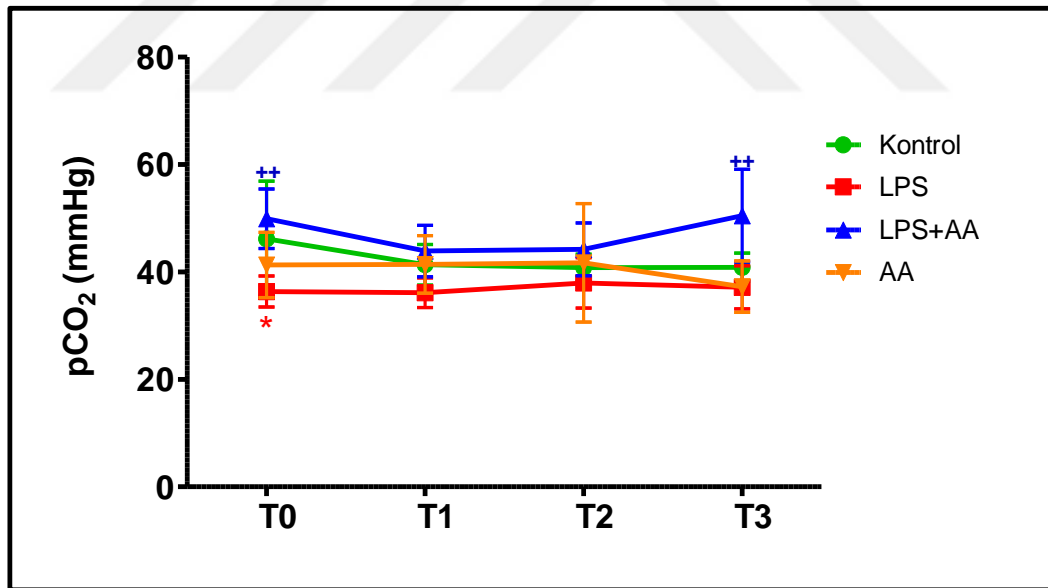
Şekil 4.2.1: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde pH düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, ***p<0.001, Kontrol grubuna göre; ++p<0.01, LPS grubuna göre; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.



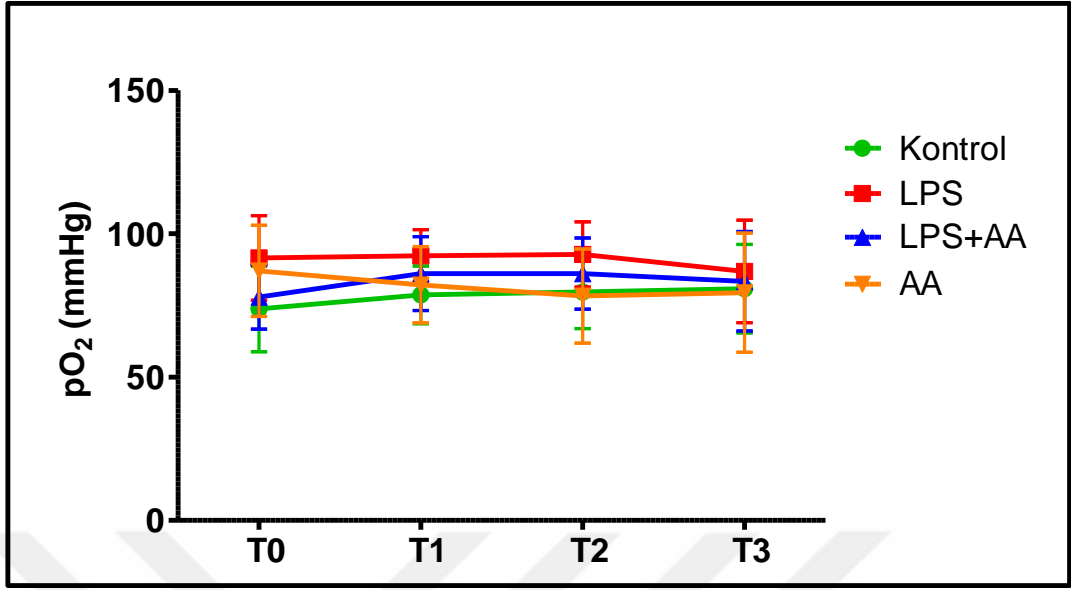
Şekil 4.2.2: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde bikarbonat [$c\text{HCO}_3^-(\text{P},\text{st})_c$] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, ***p<0.001, Kontrol grubuna göre; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, LPS grubuna göre; #p<0.01, ###p<0.001, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.



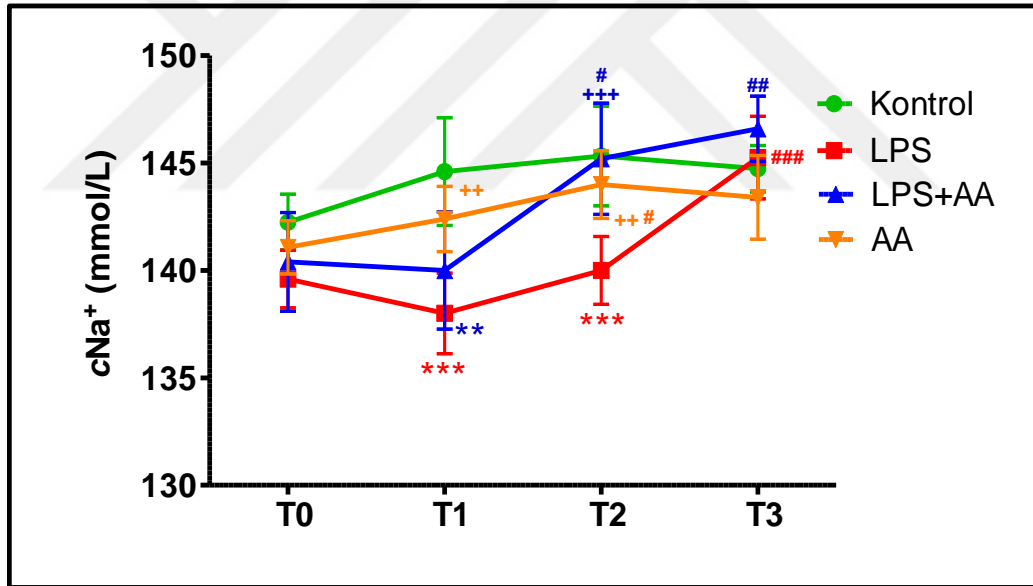
Şekil 4.2.3: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde baz fazlalığı [cBase (Ecf)] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kontrol grubuna göre; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001, LPS grubuna göre; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.



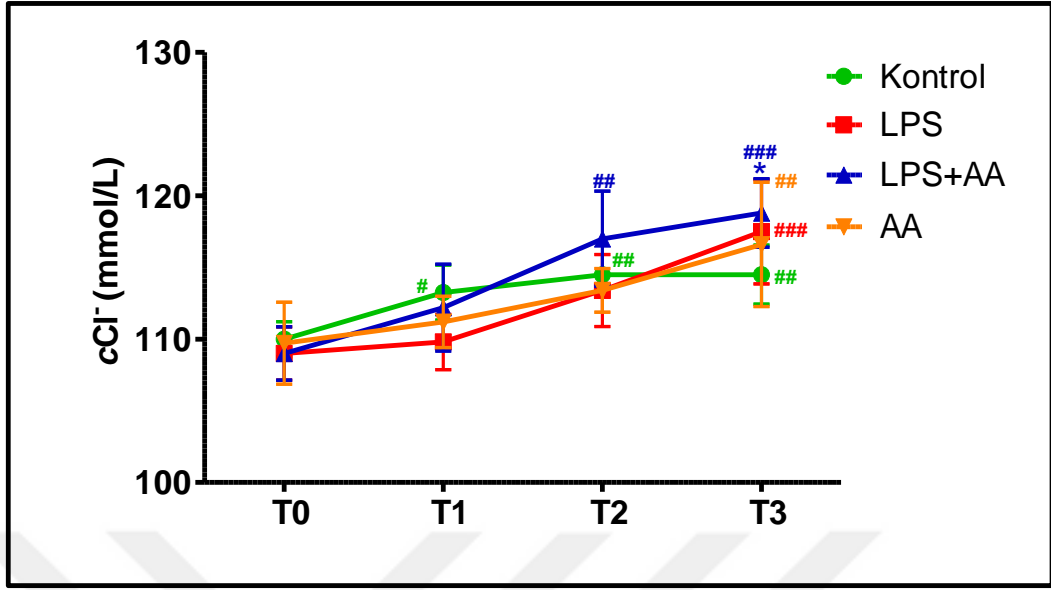
Şekil 4.2.4: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde pCO₂ düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, Kontrol grubuna göre, ++p<0.01, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



Şekil 4.2.5: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde pO₂ düzeyleri.



Şekil 4.2.6: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde cNa⁺ düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.01, **p<0.001, Kontrol grubuna göre; ++p<0.01, +++p<0.001, LPS grubuna göre; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.



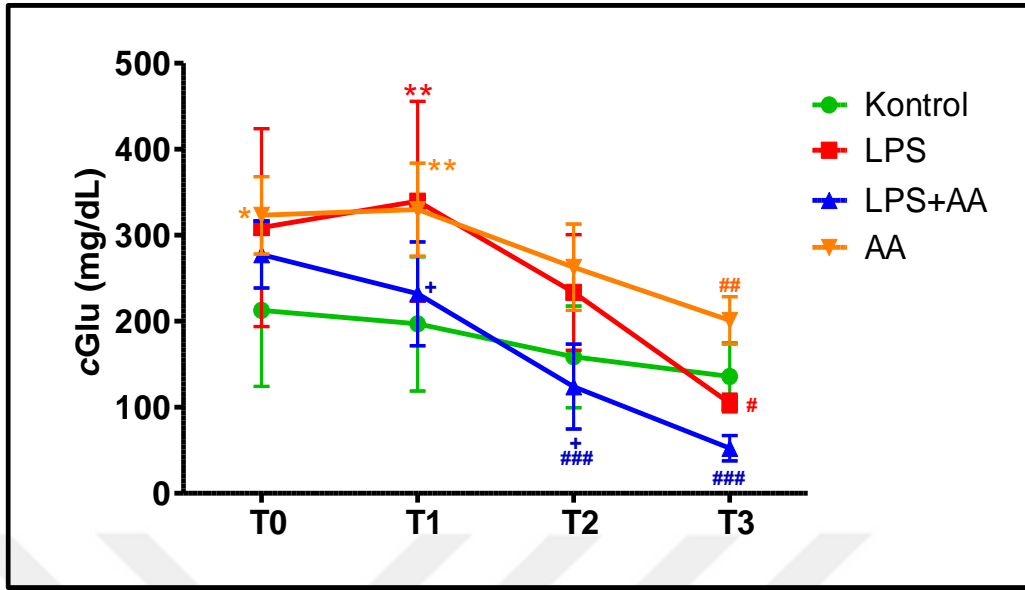
Şekil 4.2.7: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde cCl^- düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p < 0.05$, Kontrol grubuna göre; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.

Kan glikoz [cGlu] değerlerinin, LPS uygulanan grupta kontrole göre T2 ($p<0.01$) zaman noktasında arttığı tespit edildi. LPS+AA grubunda, LPS grubuna göre T1 ($p<0.05$) zaman noktasında arttığı ve T2 ($p<0.05$) zaman noktalarında azaldığı tespit edildi AA grubunda kontrol grubuna göre T0 ($p<0.05$) ve T1 ($p<0.01$) zaman noktalarında arttığı görüldü. Ayrıca, LPS grubunda T3 ($p<0.05$) zaman noktasında, LPS+AA grubunda T2 ($p<0.001$) ve T3 ($p<0.001$) zaman noktalarında ve AA grubunda T3 ($p<0.01$) zaman noktasında T0 başlangıç noktasına göre azaldığı tespit edildi (Tablo 4.2.2, Şekil 4.2.8).

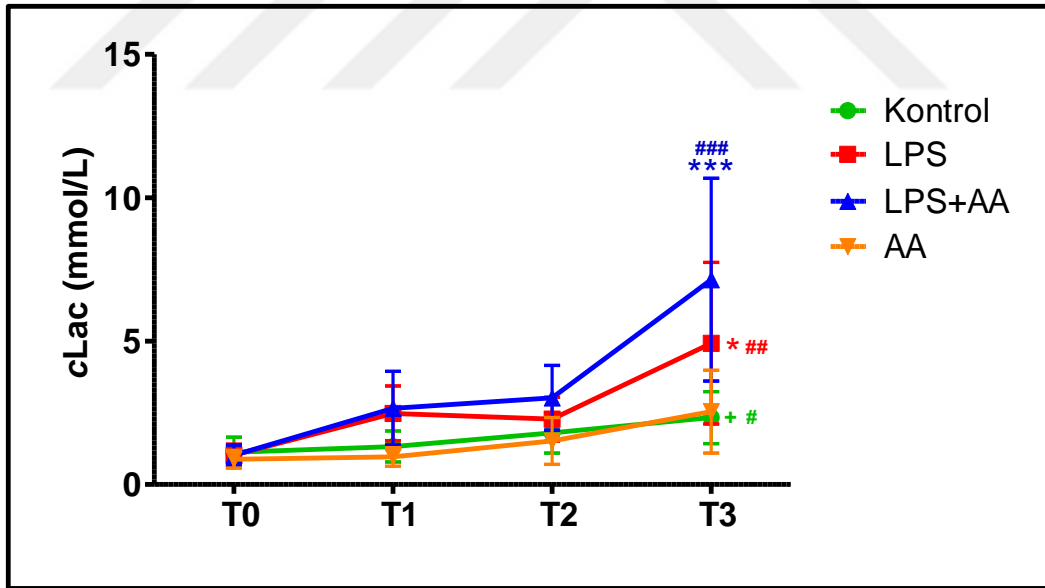
Kan laktat [cLac] değerlerinin, LPS uygulanan grupta kontrole göre T3 ($p<0.05$) noktasında arttığı görüldü. LPS+AA grubunda kontrole göre T3 ($p<0.001$) noktasında arttığı tespit edildi. AA grubunda ise LPS grubuna göre T3 ($p<0.05$) değerinin azaldığı tespit edildi. Aynı zamanda LPS grubunda T3 ($p<0.01$) noktasında, LPS+AA grubunda T3 ($p<0.001$) noktasında, AA grubunda da T3 ($p<0.05$) zaman noktasında T0 değerlerine göre arttığı tespit edildi (Tablo 4.2.2, Şekil 4.2.9).

Tablo 4.1.2.1: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde laktat [cLac] ve glikoz [cGlu] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Kontrol grubuna göre; + $p<0.05$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

		KONTROL	LPS	LPS + AA	AA
cGlu (mg/dL)	T0	212.750 ± 88.550	309.000 ± 115.050	277.600 ± 38.850	323.250 ± 44.908*
	T1	197.000 ± 77.939	339.600 ± 116.176**	232.000 ± 60.308 ⁺	329.800 ± 53.960**
	T2	158.750 ± 59.078	233.600 ± 67.203	124.000 ± 49.376 ⁺	262.800 ± 50.057
	T3	136.000 ± 38.749	105.000 ± 10.247	52.400 ± 14.690	201.000 ± 27.577
cLac (mmol/L)	T0	1.126 ± 0.526	1.026 ± 0.377	1.020 ± 0.356	0.880 ± 0.311
	T1	1.326 ± 0.545	2.480 ± 0.955	2.660 ± 1.284	0.960 ± 0.321
	T2	1.800 ± 0.704	2.280 ± 0.766	3.020 ± 1.128	1.520 ± 0.817
	T3	2.334 ± 0.908	4.926 ± 2.818*	7.140 ± 3.535***	2.540 ± 1.447 ⁺



Şekil 4.2.8: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde glikoz [cGlu] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, **p<0.01, Kontrol grubuna göre; +p<0.05, LPS grubuna göre; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.



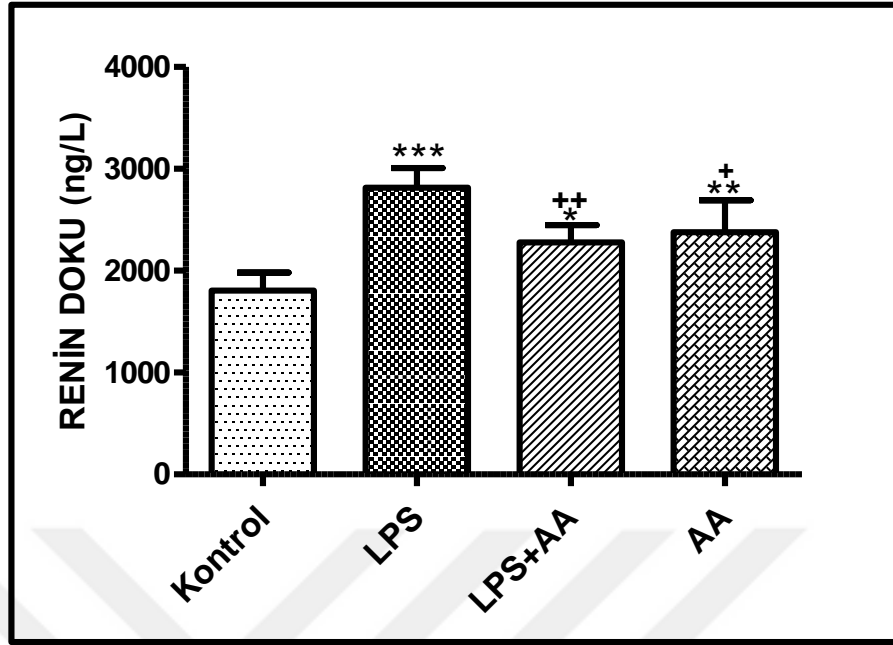
Şekil 4.2.9: Kontrol, LPS, LPS+AA ve AA gruplarına ait kan örneklerinde laktat [cLac] düzeylerinin T0, T1, T2 ve T3 zaman noktalarındaki değerleri. *p<0.05, **p<0.001, Kontrol grubuna göre; +p<0.05, LPS grubuna göre; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, T0 zaman noktasına göre istatistiksel anlamlılık.

4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR

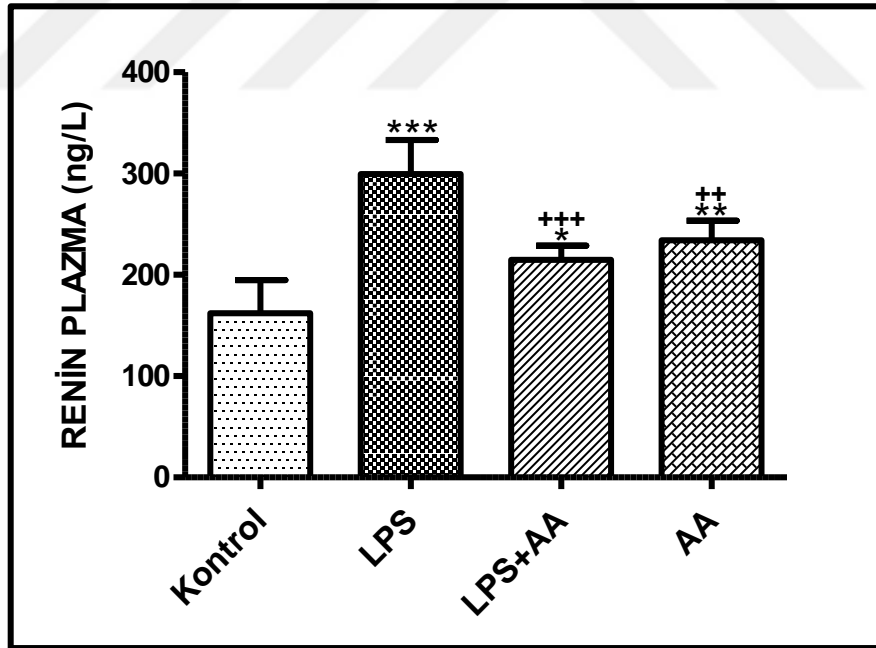
4.3.1. Doku ve Plazmadaki Renin Düzeyleri

Deney hayvanlarından alınan böbrek dokularında renin düzeyleri değerlendirildiğinde LPS uygulamasının renin düzeyini kontrole göre artırdığı ($p<0.001$) tespit edildi. LPS+AA grubunda da renin düzeyinin LPS grubuna göre azaldığı ($p<0.01$) görüldü ancak, kontrole göre ($p<0.05$) fazla olduğu tespit edildi. AA grubunda renin seviyesinin kontrole göre arttığı ($p<0.01$), LPS grubuna göre düşük olduğu ($p<0.05$) belirlendi (Şekil 4.3.1.1).

Deney hayvanlarının plazma örneklerinde renin düzeylerine bakıldığında, LPS uygulamasının renin düzeyini kontrole göre artırdığı ($p<0.001$) tespit edildi. LPS+AA grubunda, LPS infüzyonu yapılan hayvanlara AA uygulandığında da renin düzeyinin LPS grubuna göre azaldığı ($p<0.001$), kontrol grubuna göre yüksek olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. Sadece AA uygulanan gruptaki renin seviyesinin de kontrole göre arttığı ($p<0.01$), LPS grubuna göre düşük olduğu ($p<0.01$) görüldü (Şekil 4.3.1.2).



Şekil 4.3.1.1: Deney gruplarına ait doku örneklerindeki renin düzeyleri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Kontrol grubuna göre; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

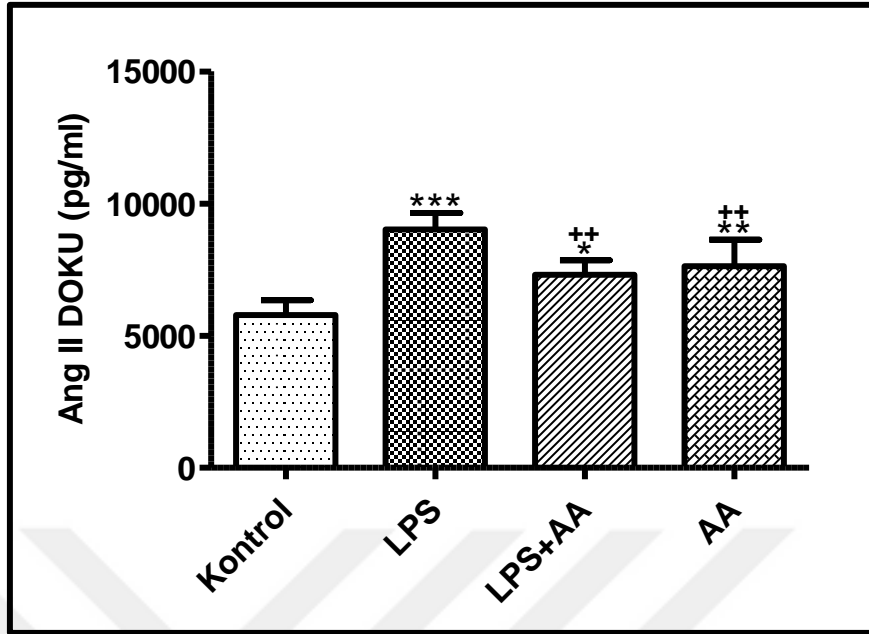


Şekil 4.3.1.2: Deney gruplarına ait plazma örneklerindeki renin düzeyleri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Kontrol grubuna göre; ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

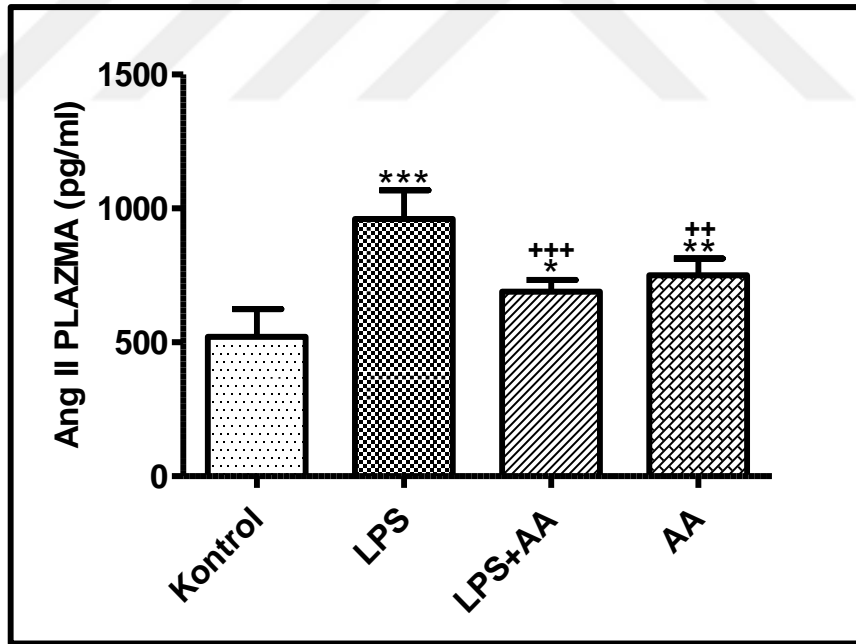
4.3.2. Doku ve Plazmadaki Anjiyotensin II Düzeyleri

Deney hayvanlarının böbrek dokusunda anjiyotensin II (Ang II) düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre LPS uygulanan grupta Ang II seviyesinin ($p<0.001$) arttığı tespit edildi. LPS+AA grubunda, LPS ile artan Ang II düzeyinin AA uygulaması ile azaldığı ($p<0.01$) ancak, kontrol grubuna göre yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. AA grubunda Ang II düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı ($p<0.01$), LPS grubuna göre ise düşük olduğu ($p<0.01$) tespit edildi (Şekil 4.3.2.1).

Deney hayvanlarının plazma örneklerinde anjiyotensin II (Ang II) düzeyleri incelendiğinde, LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre Ang II seviyesinin ($p<0.001$) arttığı tespit edildi. LPS+AA grubunda, artan Ang II düzeyinin AA uygulaması ile azaldığı ($p<0.001$) ancak, kontrol grubuna göre yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlendi. AA grubunda Ang II düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı ($p<0.01$), LPS grubuna göre ise düşük olduğu ($p<0.01$) tespit edildi (Şekil 4.3.2.2).



Şekil 4.3.2.1: Deney gruplarının doku örneklerinde Ang II değerleri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Kontrol grubuna göre; ++ $p < 0.01$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.



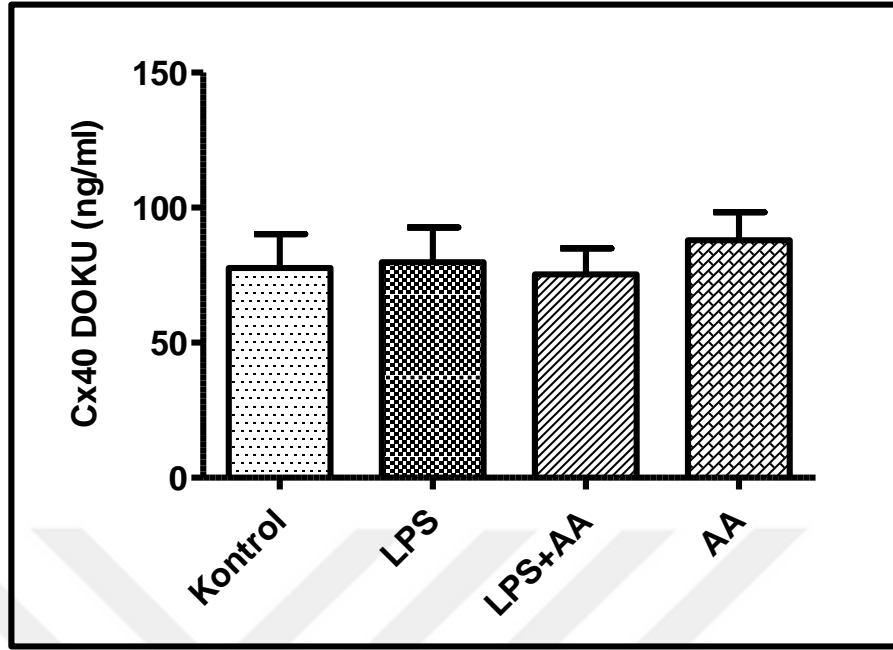
Şekil 4.3.2.2: Deney gruplarının plazma örneklerinde Ang II değerleri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Kontrol grubuna göre; ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$, LPS grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

4.3.3. Doku ve Plazmadaki Konneksin 40 Düzeyleri

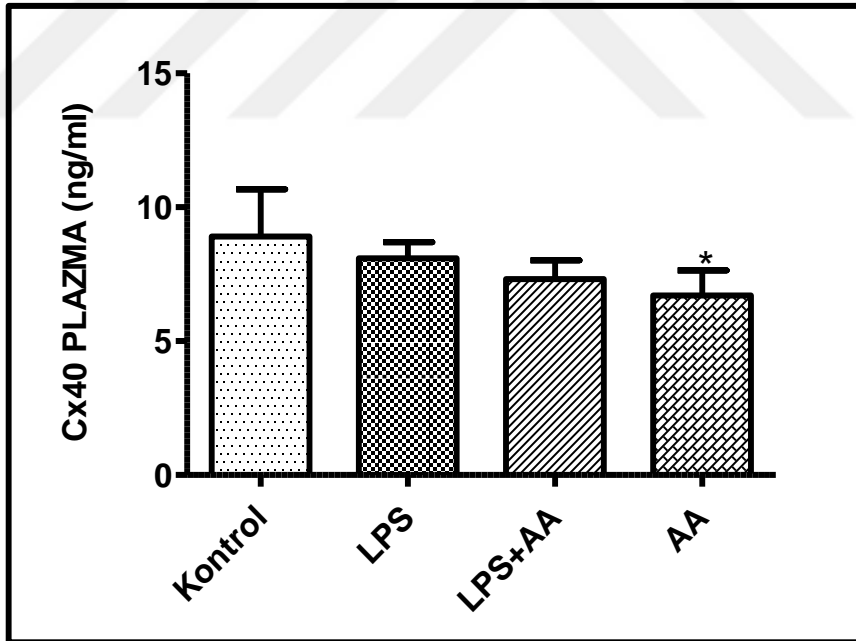
Deney hayvanlarının böbrek dokusundaki Cx40 düzeyleri incelendiğinde, Cx40 düzeyinin, kontrol grubuna göre LPS, LPS+AA ve AA gruplarında anlamlı bir değişiklik görülmedi (Şekil 4.3.3.1).

Deney hayvanlarının plazmalarındaki Cx40 düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre LPS uygulanan grupta Cx40 seviyelerinin azaldığı görülse de anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. AA grubunda Cx40 düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığı ($p<0.05$) belirlendi (Şekil 4.3.3.2).





Şekil 4.3.3.1: Deney gruplarının dokularındaki Cx40 değerleri.



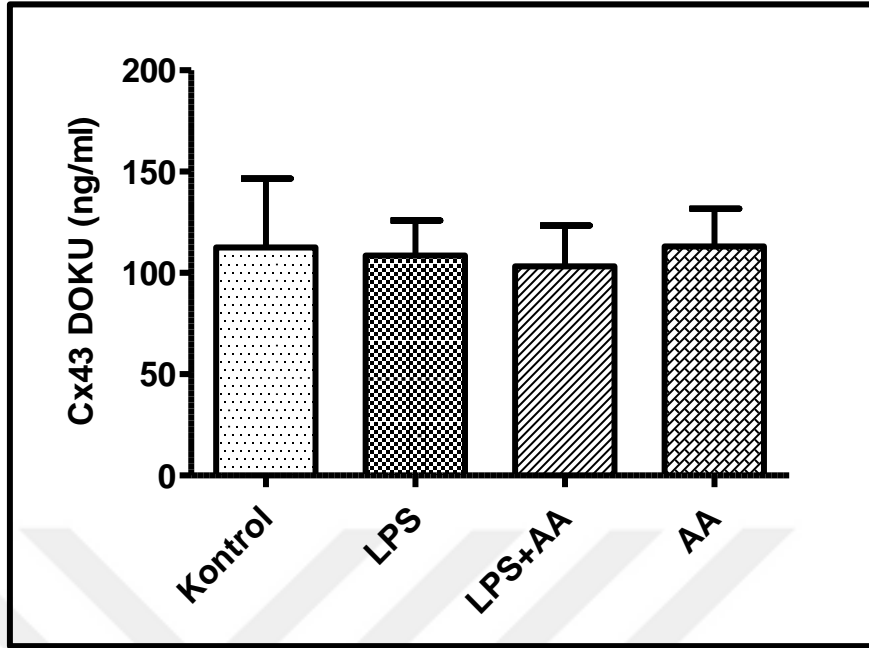
Şekil 4.3.3.2: Deney gruplarının plazma örneklerinde Cx40 değerleri. * $p < 0.05$, Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

4.3.4. Doku ve Plazmadaki Konneksin 43 Düzeyleri

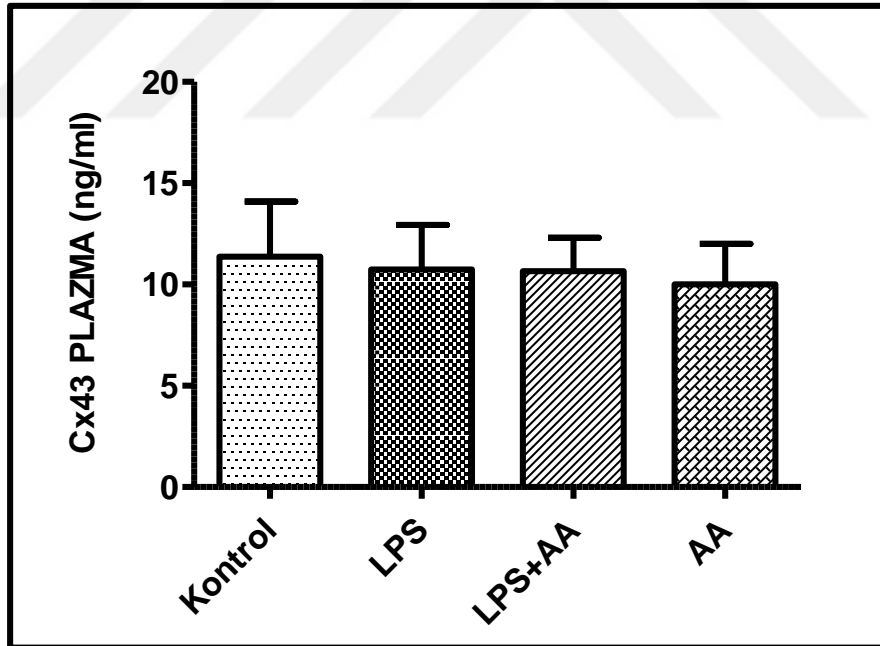
Deney hayvanlarının böbrek dokusundaki Cx43 düzeyleri incelendiğinde, Cx43 düzeylerinin LPS ve LPS+AA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre azaldığı görülse de anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi (Şekil 4.3.4.1).

Deney hayvanlarının plazmalarındaki Cx43 düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre LPS, LPS+AA ve AA gruplarında Cx43 seviyelerinin azaldığı görülse de anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi (Şekil 4.3.4.2).





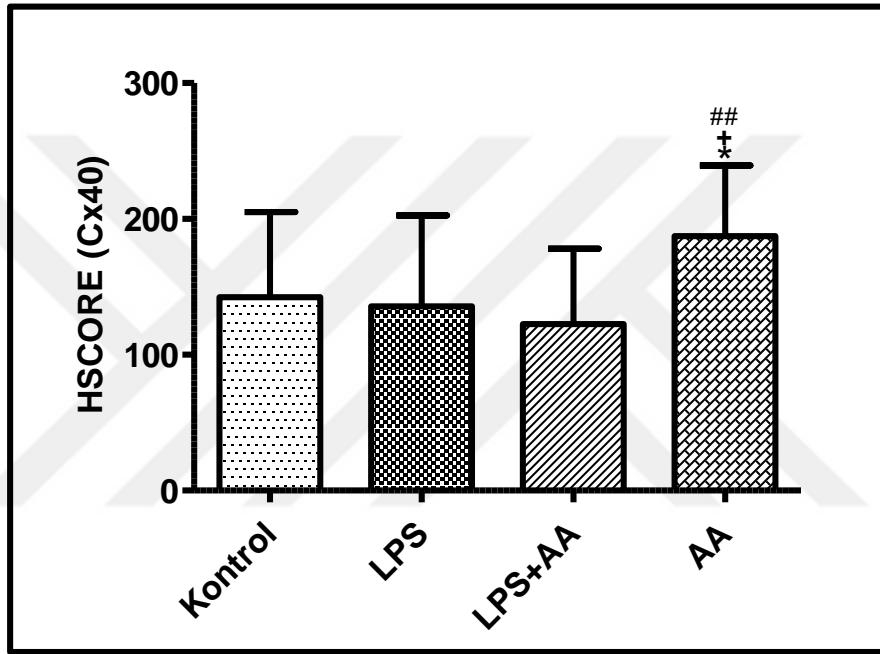
Şekil 4.3.4.1: Deney gruplarının dokularındaki Cx43 değerleri.



Şekil 4.3.4.2: Deney gruplarının plazmalarındaki Cx43 değerleri.

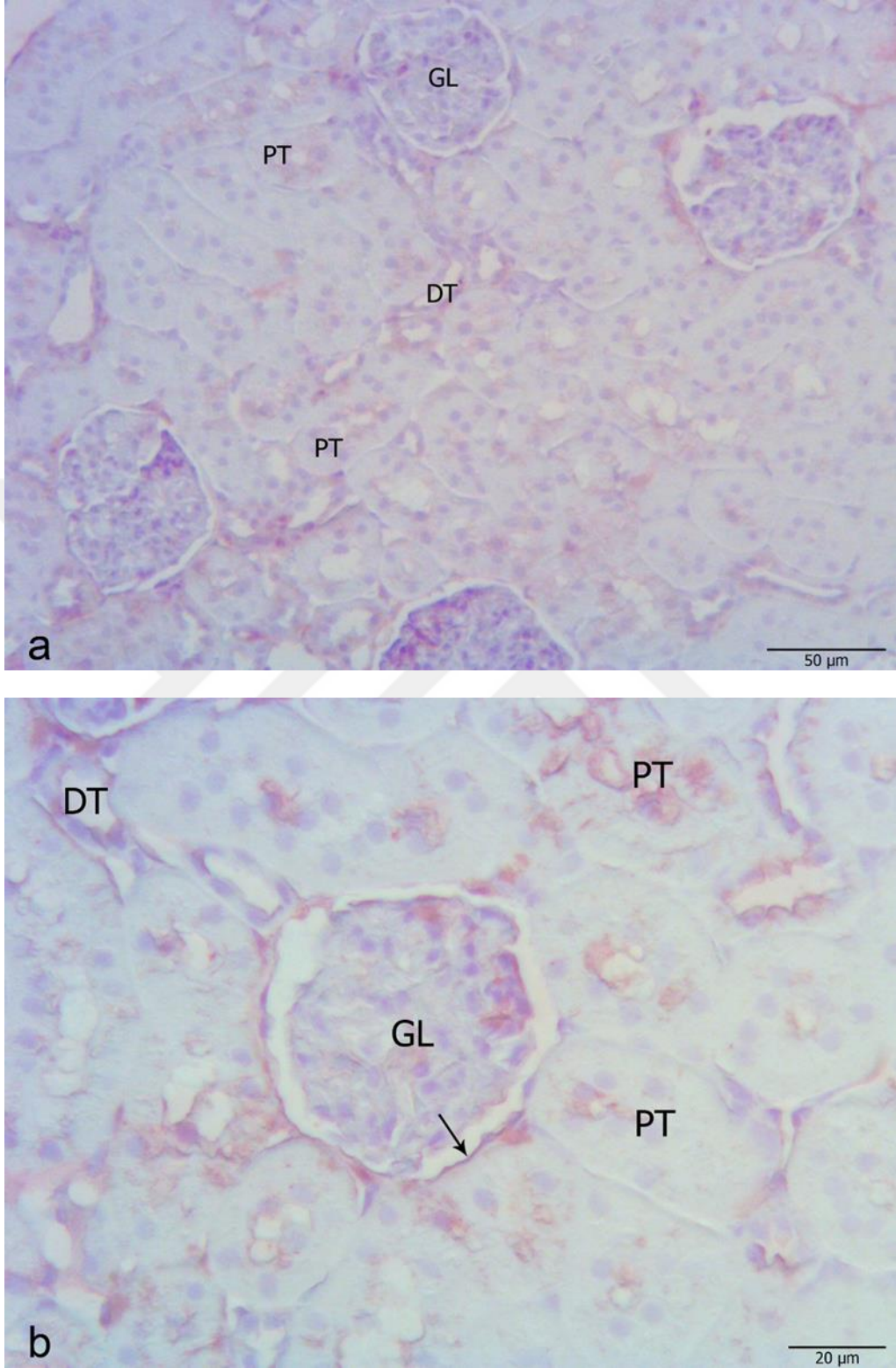
4.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Deney hayvanlarından alınan böbrek kesitlerinde immünohistokimyasal olarak Cx40 reaksiyonunun yoğunluğu ve dağılımı HSCORE yöntemi ile değerlendirildi. Cx40 reaksiyonunun LPS ve LPS+AA grubunda, kontrol grubuna göre azaldığı görülse de anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi. AA grubunda Cx40 reaksiyonunun kontrol ($p<0.05$), LPS ($p<0.05$) ve LPS+AA ($p<0.01$) gruplarına göre arttığı tespit edildi (Şekil 4.4.1).

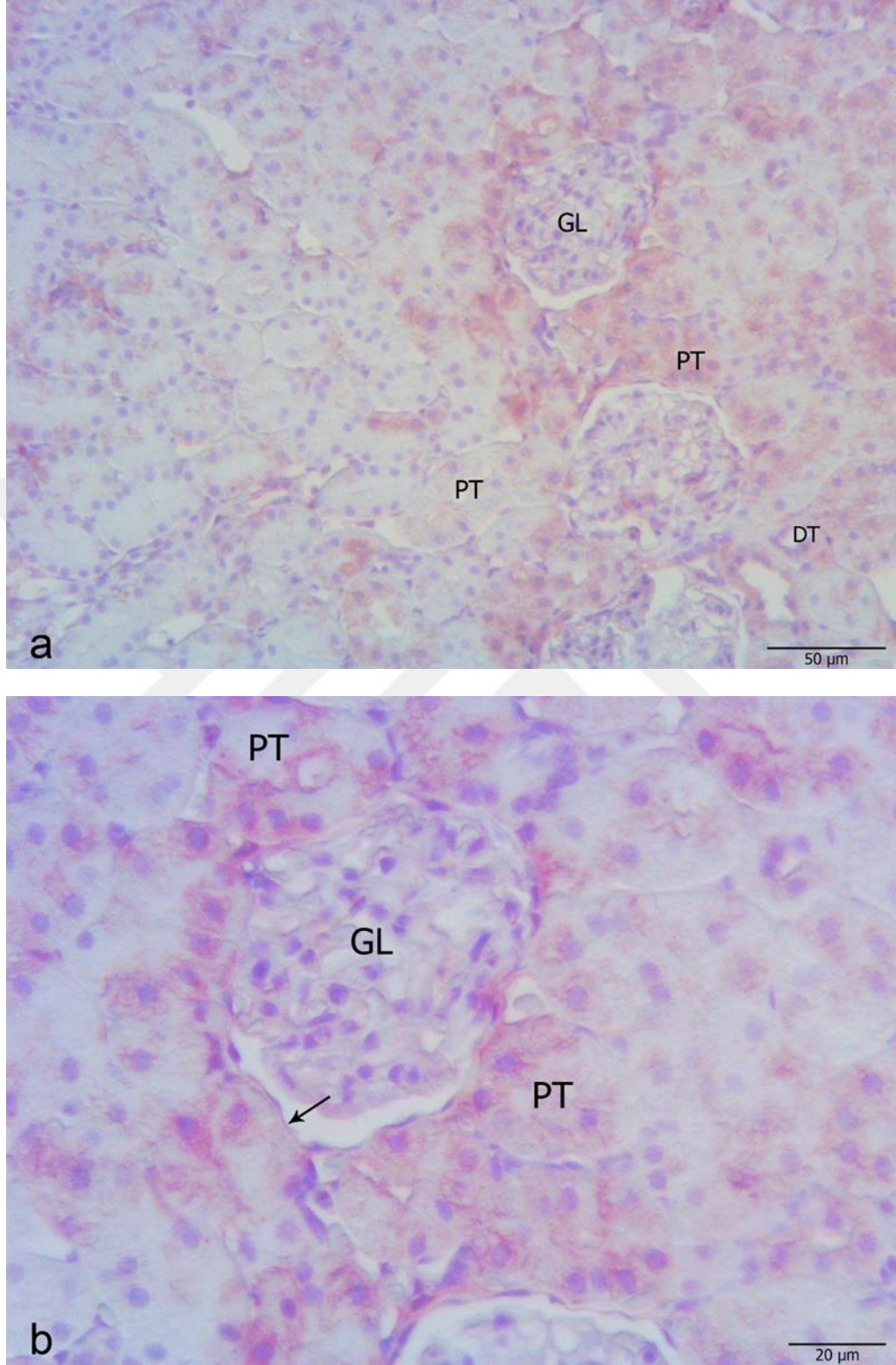


Şekil 4.4.1: Deney gruplarına ait hayvanların böbrek dokusunda Cx40 reaksiyonu (HSCORE). * $p<0.05$, Kontrol grubuna göre; † $p<0.05$, LPS grubuna göre; ## $p<0.01$, LPS+AA grubuna göre istatistiksel anlamlılık.

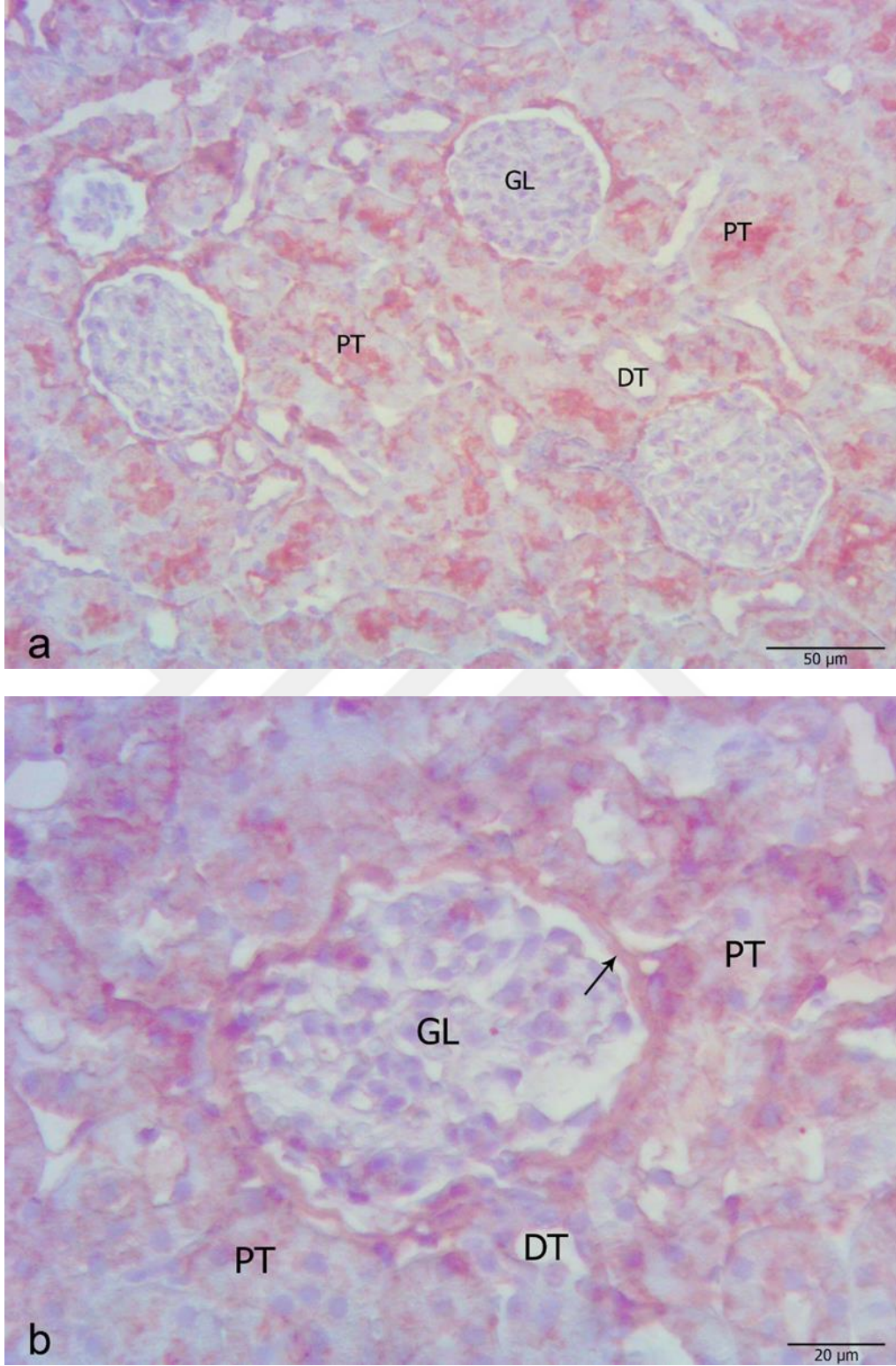
Kontrol grubunda Cx40 reaksiyonu, bazı proksimal tübüllerin fırça kenarlarında, distal tübüllerin apikalinde ve pariyetal yaprakta tespit edildi (Şekil 4.4.2). LPS grubunda Cx40 reaksiyonu genel olarak proksimal tübüllerin fırça kenarlarında, distal tübüllerin apikalinde ve pariyetal yaprakta kontrol grubuna göre daha yaygın olduğu tespit edildi (Şekil 4.4.3). LPS+AA grubunda proksimal tübüllerde, distal tübüllerde, pariyetal yaprakta Cx40 reaksiyonu tespit edildi (Şekil 4.4.4). Sadece AA verilerek oluşturulan deney grubunun böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu yoğun olarak proksimal tübüllerde tespit edildi. Ayrıca Cx40 reaksiyon yoğunluğunun distal tübül ve pariyetal yaprakta kontrol grubundan ve LPS grubundan daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4.4.5).



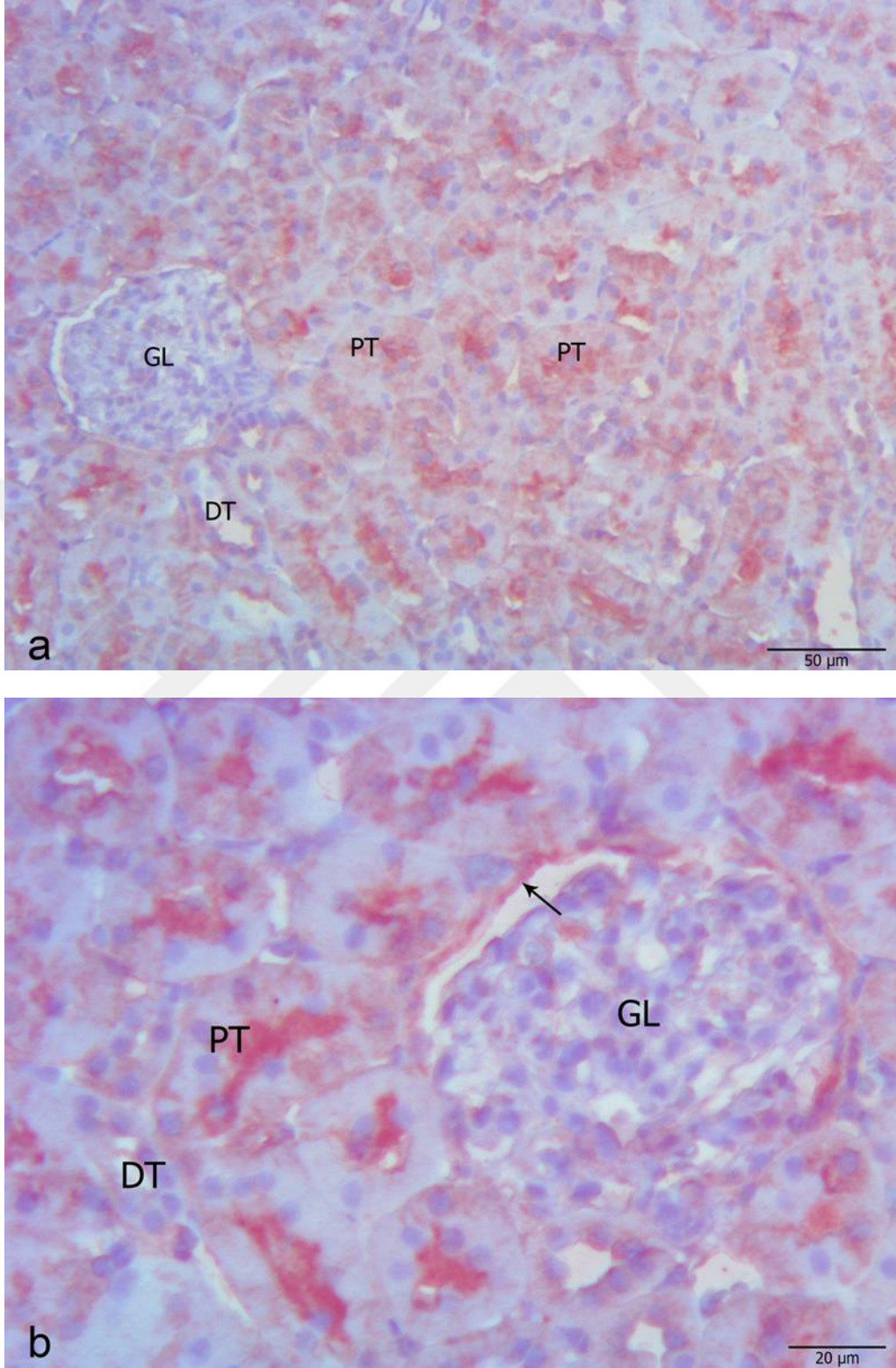
Şekil 4.4.2: Kontrol grubuna ait hayvanların böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu. Glomerulus (GL), distal tübül (DT), proksimal tübül (PT) ve pariyetal yaprak (→). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.4.3: LPS grubuna ait hayvanların böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu. Glomerulus (GL), distal tübül (DT), proksimal tübül (PT) ve pariyetal yaprak (→). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.4.4: LPS+AA grubuna ait hayvanların böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu. Glomerulus (GL), distal tübül (DT), proksimal tübül (PT) ve pariyetal yaprak (→). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.



Şekil 4.4.5: AA grubuna ait hayvanların böbrek kesitlerinde Cx40 reaksiyonu. Glomerulus (GL), distal tübül (DT), proksimal tübül (PT) ve pariyetal yaprak (→). a) Bar: 50 µm, b) Bar: 20 µm.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda LPS uygulanmasıyla oluşturulan endotoksemide jukstaglomerular hücrelerden renin salınımında fonksiyonel konneksin proteinleri ile askorbik asit arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada öncelikli olarak LPS uygulanmasıyla ortaya çıkan hipotansiyon tablosunda, azalan kan basıncı üzerine AA'nın etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır ve endotoksemi modelinde gösterildiği gibi kan basıncının düştüğü ve deney sonuna kadar bu tablonun devam ettiği görülmüştür.

Endotoksemide kemokinlerin, vazoaaktif aminlerin, reaktif oksijen türlerinin, reaktif nitrojen türlerinin ve pıhtılaşma sistemlerinin aracılık ettiği sistemik inflamatuvar yolakta, proinflamatuvar sitokinlerin belirgin bir şekilde arttığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Proinflamatuvar artışı, anti-inflamatuvar yetersizliği, endotoksemi ve septik şokta, doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi başta olmak üzere, solunum, sindirim, boşaltım ve dolaşım sistemlerinde tetiklenen sistemik inflamatuvar yollar ile bağlantılıdır. Endotoksemi, çoklu organ yetmezliği ve devamında ölüme neden olur (Tunctan ve diğ.,2018). Endotoksemiye neden olan Gram (-) bakterilerin hücre duvarının ana bileşeni olan LPS, bağışıklık sisteminin ana hedefidir (Palsson- Mcdermott ve O'neil, 2004). LPS'nin tanınmasının ardından nükleer faktör-kappa B (NF-κB) aktivasyonu, nükleer translokasyonu özellikle sitokin gen promotörlerinin aktivasyonu, IL-1, interlökin-6 (IL-6) ve TNF-α'nın aktivasyonu gerçekleşir (Silva ve diğ., 2008; Pawar ve diğ., 2006). LPS uygulamasıyla ortaya çıkan endotoksemi durumunda hipotansiyon hipoperfüzyona bağlı olarak organ yetmezliği yaratır (Leone ve diğ., 2015). Hipotansiyon endotoksemik hastalarda ilk gözlenen değişkenlerden biridir. RAS'ın bir bileşeni olan Ang II, sodyumun emilimini artırmak için doğrudan arteriyolar vazokonstrüksiyon ve aldosteron salınımının uyarılması yoluyla plazma hacmini ve OAB'yi düzenler (Erwin ve diğ., 2017). Bu veriler LPS'nin kan damarlarında vazodilatasyon meydana getirerek kan basıncını önemli oranda düşürdüğünü ve devamında da RAS'ın aktive olduğunu göstermektedir (Suba ve diğ., 1992; Szabo ve diğ., 1993; Yamaguchi ve diğ., 2006; Tunctan ve diğ., 2012; Tunctan ve diğ., 2013; Erwin ve diğ., 2017; Tunctan ve diğ., 2018).

Bizim çalışmamız da artan LPS'nin sistemik kan basıncının düşmesinde önemli bir etmen olduğunu gösterdi. Aynı zamanda OAB'nin azalmasıyla RAS'ın aktive olduğu da görüldü.

Endotoksemik hastalarda oksidatif stresin yanında plazma askorbat düzeyinin azalmış olduğu görülmüştür. Diğer antioksidanların da endotoksemiden etkilenmesine rağmen, AA konsantrasyonu ile sağkalım arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Goode ve Webster, 1993; Galley ve diğ., 1996).

Ex vivo çalışmalar, hücrel aktivitenin uygulanan AA tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Endotoksin uygulanan farelerin makrofajlarının artan adezyonunun ve süperoksit anyon üretiminin AA varlığında azaldığı gösterilmiştir (Victor ve diğ., 2000).

In vitro çalışmalar, AA'nın bakterilerin replikasyonunu inhibe ettiğini ve kültürlenmiş mikrovasküler endotel hücrelerinde hidrojen peroksit hasarını önlediğini göstermiştir (Armour ve diğ., 2001). Salvo ve diğ. (1995)'nin yaptığı çalışmada, insanlar gibi AA üretemeyen kobaylarda endotoksemi durumunda AA uygulamasının oksidatif hasarı önlediğini göstermişlerdir. Ergin ve diğ. (2015), iskemi/reperfüzyon hasarında AA uygulamasının böbrekteki hasar oluşumunu, inflamasyonu ve oksidatif stresi önlediğini göstermişler, ancak AA'nın hemodinamik ve idrar fonksiyonlarının düzenlenmesinde bir rolünün olmadığını belirtmişlerdir. Bizim bulgularımızda da AA'nın LPS uygulanan grupta OAB'nin düzenlenmesinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü.

Endotoksemide ve septik hastalarda hemodinamik desteğin öncelikli amacı etkili doku perfüzyonu ve normal hücre metabolizmasını sağlamaktır. Hemodinamik iyileştirmede hedef damar içi hacim, kan basıncı ve kardiyak atımı kapsamaktadır. Kan hacminin düzenlenmesi sağ kalımda öncelikli hedeftir (Constable, 2007).

Kan basıncı düşmesinin yanında kan elektrolit dengesi ve doku oksijenlenmesinde de önemli değişiklikler olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Hansell ve diğ., 2013; Guyton diğ., 1972). Endotoksemi sistemik olarak kan gazlarının, dolayısıyla pH'sının değişmesinde ve glikoz metabolizmasında etkili olmaktadır. Çalışmamızda deney esnasında baz fazlalığının, HCO_3^- 'ün, Na^+ 'nın, ve Cl^- 'nin LPS uygulamasından kısa bir süre sonra düşmeye başladığı ve deney sonunda da kontrol değerlerle karşılaştırıldığında anlamlı farkın olduğu görüldü. AA uygulanmasından sonra bu değerlerden HCO_3^- 'ün, Na^+ 'nın arttığı ve normal değerlere yaklaştığı görüldü.

Palma ve diğ. (2003)'nin yaptığı çalışmada, yoğun bakım ünitelerindeki septik şok hastalarında tedavinin üçüncü gününde standart baz fazlalığındaki iyileşmenin daha iyi bir sonuç için güçlü

bir belirleyici olduğu gösterildi. Rivers ve diğ. (2001)'nin çalışmalarında, endotoksemide “altın saatler” olarak isimlendirilen erken dönemin önemli olduğu ve yoğun bakımda bu dönemin tedavisinde kontrol grubuna göre hedef grubun baz fazlalığının ilk gün azaldığı ancak tedavinin üçüncü gününde normal değerlere ulaştığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise standart baz fazlalığının LPS uygulamasıyla azaldığı, AA uygulamasının bu duruma olumlu bir etkisinin olmadığı görüldü.

Endotokseminin akut fazında asid-baz dengesinde bozulmalar görülebilir. Pulmoner vazokonstriksiyon nedeniyle solunum asidozu ve sonra laktik asit artışı gibi metabolik değişikliklerden dolayı metabolik asidoz gelişir (Andersen, 2003; Constable, 2007). Birçok çalışma, metabolik asidoz düzeyini ve hastanede kalış süresinin tahmini etkilerini göstermiştir (Ganesh ve diğ., 2016). Hiperkloremik metabolik asidoz endotokseminin sık görülen bir özelliğidir. Çoğu zaman asidozun kaynağı en azından kısmen iyatrojeniktir, çünkü tuz çözeltisi resüsitasyonu, şoku tedavi etmek için sıklıkla kullanılır. Büyük hacimli tuz çözeltisi infüzyonu, plazma sodyum konsantrasyonuna göre plazma klorür konsantrasyonunu artırarak metabolik asidoza neden olur (Kellum ve diğ., 1998; Rehm ve diğ., 2000). Böylece pozitif ve negatif yüklü elektrolitler arasındaki iyon farkı azalır ve bu da elektriksel nötrlüğü korumak için serbest hidrojen iyonlarında artışa neden olur (Stewart, 1983).

Metabolik asidoz, çeşitli mekanizmalarla endotoksemide sağ kalımı azaltabilir. İlk olarak asidoz, hemodinamik ile ilişkilendirilmiş ancak tutarlı sonuçlar elde edilemeyince bu mekanizma belirsiz kalmıştır (Opie, 1965; Cooper ve diğ., 1993). Pedoto ve diğ. (1999), metabolik asidozun iNOS'u artırabileceğini, bunun da vazodilatasyon dolayısıyla şoka neden olabileceğini göstermiştir. İkinci olarak asidozun, inflamatuvar sitokinlerin anlatımında değişikliğe yol açabileceği göstermiştir. Asidoz durumunda sağ kalım süresinin pH'daki azalmayla ve serumdaki Cl⁻ seviyesindeki artışla negatif olarak ilişkilendirildiği, pH'daki düşüşün laktat, Cl⁻ ve pCO₂'deki değişikliklerle gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu nedenle, genel olarak asidoz yerine hiperkloremik asidoz, endotoksemik hayvanlarda erken ölüm ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Kellum ve diğ., 2004).

Endotoksemide asidoz tiplerinin anlaşılması ve tedavinin seyri boyunca geliştirilmesi, bu hastalarda asit-baz dengesinin davranışını anlamamızı gerektirir. Laktik asidoz çoğunlukla endotoksemi ile ilişkilendirilir (Smith ve diğ., 2001). Kanda artmış laktat konsantrasyonu (hiperlaktatemi) ve laktik asidoz (hiperlaktatemi ve serum pH <7.35) şiddetli endotoksemi veya

septik şokta sık görülür ve önemli morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Endotokseminde ve septik şokta, laktik asidoz, geleneksel olarak, tüm vücuda oksijen iletiminin, oksijen gereksinimlerini karşılamadığında doku hipoksisinin bir sonucu olarak açıklanmıştır (Huckabee, 1961). Septik şok tedavisinin hedefi olarak laktat boşluğunun kullanılması umut vericidir, ancak asla tek başına bir biyobelirteç olmayacaktır; her zaman ek klinik bilgilerle birleştirilmelidir (Suetrong ve Walley, 2016). Ergin ve diğ. (2015), iskemi/reperfüzyon hasarında sıçan böbreği üzerinde yaptıkları çalışmada, intravenöz AA uygulamasının, mikrovasküler dolaşım ve oksijenlenme üzerindeki koruyucu etkisinin bir sonucu olarak plazmadaki laktat seviyesini artırabildiğini göstermişler. AA'nın oksidatif stresin yükselişini tamamen önleyebildiğini ve kısmen de olsa renal mikro dolaşımdaki oksijenlenmeyi iyileştirdiğini, böbrek iltihabı ve doku hasarında azalma gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Bizim sonuçlarımız da yukarıdaki verilerle benzerlik gösterecek şekilde laktat seviyesinin artışı yanında pH ve bikarbonat azalması sonucu LPS uygulamasının laktik asidoza neden olduğunu ve ayrıca AA uygulamasının da Ergin ve diğ. (2015)'nin çalışmalarına benzer şekilde laktik asidozu önlemediğini aksine artırdığını gözlemledik.

Klorür vücudun ana anyonudur, plazmadaki negatif yüklerin üçte ikisini temsil eder ve ayrıca plazma tonikliğinin üçte birinden sorumludur (Berend ve diğ., 2012). Yoğun bakım hastalarının % 25'inde klorür anormallikleri tespit edilmiş olmasına rağmen, asit baz dengesi, ozmoz, kas aktivitesi ve immünomodülasyondaki rolü ve önemi diğer serum elektrolitleri tarafından gölgede bırakılmıştır (Tani ve diğ., 2012). Wilcox (1983) tarafından yapılan araştırma, klorür içeren çözeltilerin intrarenal infüzyonunun renal vazokonstrüksiyona yol açtığını ve glomerular filtrasyon hızını düşürdüğünü göstermiştir. Renal damarlara özgü gibi görünen, klorür kaynaklı vazokonstrüksiyonun önceki tuzların tükenmesiyle ve tübüler Cl⁻ nin yeniden emilimi ile ilişkili olduğu desteklenmiştir (Wilcox, 1983). Quilley (1993) tarafından yapılan deneysel bir çalışma, izole sıçan böbreğinin daha yüksek Cl⁻ konsantrasyonuna maruz kalmasının, Ang II'nin vazokonstrüktör etkisini artırdığını göstermiştir. Hücre dışı sıvının ana anyonu olan klorür, insan organizmasının homeostazında önemli bir unsur oluşturur. İster endotoksemi işleminin sonucu isterse suprafizyolojik klorür sıvıları ile tedavinin sonucu olsun, hiperkloremi, endotoksemik hastaların klinik sonuçları üzerinde olumsuz bir etkiye sahip görünüyor. Hiperkloremik asidozun inflamatuvar yanıt, hemodinamik ve ayrıca insanlarda yapılan çalışmalarda ve endotokseminin bazı deneysel modellerinde gösterilen organ veya sistemlerin homeostazı üzerindeki zararlı etkisi önem verilmesi gereken bir konu olarak durmaktadır.

Çalışmamızda Cl^- iyonu değerlerinin, LPS uygulamasıyla arttığı görülse de anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi. AA'nın iv olarak bu gruba uygulanmasından sonra da Cl^- iyonu seviyesinin normal bireylere nazaran hala yüksek olduğu ve AA'nın Cl^- iyonu seviyesini düzenlemede etkili olmadığı görüldü.

Endotokseminin erken döneminde hepatik glikojenin mobilizasyonu ve glikoz üretiminin artışına bağlı olarak gelişen hipergliseminin aksine endotokseminin uzaması ya da geç dönemde hepatik glikoz üretiminin azalmasıyla birlikte hipoglisemi yaygın bulgulardandır (Constable, 2007). Endotoksemik hastalarda hiperglisemi sıklığının % 40'ın üstünde olduğu tahmin edilmektedir. Bu durumun zayıf immün cevap, artmış kardiyovasküler olaylar, trombozis ve geç kalınmış tedavi gibi durumların artışıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Yoğun insülin tedavisi ile kan glikoz düzeyinin 80-110 mg/dL arasında olmasının mortaliteyi, enfeksiyon hızını, hastanede kalış süresini ya da renal replasman ihtiyacını azalttığına dair kanıtlar bulunmamaktadır (Çobaner, 2017).

Şiddetli endotoksemi ve septik şok sırasında görülen en dikkat çekici patofizyolojik değişiklik metabolik düzensizliktir. Metabolik değişiklikler arasında hiperglisemi en önemlisidir (Taylor ve Beilman, 2005; Sung ve diğ., 2005). Endotoksemi ya da septik şok yaşayan yoğun bakım ünitelerindeki hastaların sağ kalımlarının glikoz düzeylerinin ayarlanmasıyla ilişki olduğu ve hiperglisemiye yönelik tedavi yaklaşımlarının yoğun bakım ünitesinde Van den Berghe ve diğ. (2001, 2006)'nın glisemik kontrole olan etkinliğini bildirdiği araştırmalarının ardından ilgi görmeye başlamıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan geniş çaplı bir çalışma, bu tür glisemik kontrolün yoğun bakım ünite mortalitesini azaltmada etkili olmadığını ve yoğun insülin tedavisi ile glisemik kontrolün hipoglisemi riskini ve hipoglisemiden kaynaklanan komplikasyonları artırdığını göstermiştir (Finfer ve diğ., 2009). Kandaki glikoz seviyesinin değişkenliğinin, septik hastalarda mortaliteden bağımsız olduğu ancak endotoksemi ciddiyetinin kandaki glisemik değişiklik üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Ali ve diğ., 2008; Waeschle ve diğ., 2008).

Shigeki ve diğ. (2015) de anormal kan glikoz düzeylerinin hastalığın şiddeti ve mortalitesini etkileyebildiğini bildirmişlerdir. Hipergliseminin, hastalık ve ölüm ile ilişkili olmasına rağmen, kronik diyabetin, hiperglisemi ve ölüm arasındaki ilişkiyi zayıflatabileceği de ileri sürülmüştür (Dungan ve diğ. 2009). Birçok çalışma, önceden hipertansiyonu olan diyabeti olmayan hastaların, önceden diyabeti olanlardan daha kötü sonuçlara katlanmak zorunda kaldığını

göstermiştir (Dungan ve diğ. 2009; Lepper ve diğ., 2012; Whitcomb ve diğ., 2005). Bu da diyabetli hastaların diyabetli olmayanlara göre daha düşük bir ölüm riskine sahip olduğunu düşündürmektedir (Van den Berghe ve diğ., 2003). Bizim çalışmamızda da elde edilen glikoz değerlerinin LPS grubunda önce artıp sonra azalması Dungan ve arkadaşları (2009)' nın yaptığı çalışmada ileri sürdükleri düşünceyi desteklemektedir. Ayrıca çalışmamızda AA verilen grupta da glikoz seviyesinin önce arttığı ancak deney süresinin sonlarına doğru T2 ve T3 zaman noktalarında azaldığı görülmüştür. Bunun sonucunda AA'nın endotoksemik deney modelinde glikoz metabolizmasında olumlu bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Endotoksemi sırasında RAS aktivasyonu, deneysel ve klinik çalışmalarda gözlemlenen ve iyi bilinen bir fenomendir (Schaller ve diğ., 1985; Tamion ve diğ., 2004). Ancak, şu ana kadar bilgilerimizin çoğu septik şok sırasında RAS sistemi hakkında, sağlıklı kemirgenler (Schaller ve diğ., 1985; Bucher ve diğ., 2001a; Wan ve diğ., 2009), koyunlar (May ve diğ., 2012; Klein ve diğ., 2013) veya domuzlarla (Correa ve diğ., 2014) yapılan birkaç deneysel çalışmalardan gelmektedir.

Endotoksemi, dolaşımda birçok vazoaaktif maddeyi serbest bırakarak karmaşık bir nörohumoral yanıtı tetikler (Cuesta ve diğ., 2012). Dört ana mekanizma, endotoksemide etkili dolaşım hacminde ve arteriyel kan basıncı düzenlenmesinde rol oynar. Bu mekanizmalar sempatik sinir sistemi aktivasyonu, nörohipofiz tarafından arginin vazopressin salınımı, atriyal ve serebral natriüretik peptid salgılanmasının inhibisyonu ve jukstaglomerüler hücreler tarafından renin salgılanmasıdır. Bu mekanizmalar sonucunda plazmada Ang II seviyesi düzenlenmektedir (Rohlf ve Ober, 1995).

RAS, kan basıncı ve sıvı dengesi için önemli düzenleyici sistemlerden biridir. Kan basıncı üzerindeki etkisi ile birlikte, aynı zamanda inflamasyon ve bağışıklık cevaplarına kadar bir dizi süreci etkiler. Reninin substrat proteini olan anjiyotensinojen, renin ve ACE tarafından iki aşamalı bir reaksiyonla işlenir. Klasik RAS, spesifik proteazlarla protein substratlarının ardışık bölünmesi yoluyla, çok fonksiyonlu peptid hormonu Ang II üretilir. RAS için birincil substratı anjiyotensinojendir. Karaciğer ana anjiyotensinojen kaynağı iken, böbrek de dahil olmak üzere diğer dokularda da üretilir. RAS'ın etkileri Ang II'nin spesifik reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanması sonucu gerçekleştirilir. Ang II, beyin, kalp, böbrek, damar sistemi ve bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere vücudun hemen hemen her sistemini etkiler. Ang II sentezinin veya aktivitesinin farmakolojik inhibitörlerinin, kardiyovasküler terapötiklerde son derece

yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Endotoksemi ve ileri aşamada endotoksemi ABY ile yakından ilişkilidir (Wang ve diğ., 2002) Yapılan çalışmalar sonucunda endotoksemi sırasında plazmada renin, Ang I ve Ang II aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Doerschug ve diğ., 2010). RAS aktivasyonu, böbrek (Du Cheyron ve diğ., 2003) ve pulmoner (Imai ve diğ., 2005; Klein ve diğ., 2013) hasarın gelişimi ve organ fonksiyon bozukluğunun (Doerschug ve diğ., 2010) ciddiyeti ile ilişkili oksidatif stres ve endotel fonksiyon bozukluğuna (Lund ve diğ., 2007) katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Wan ve diğ. (2009)'nın koyunlarda yaptığı hiperdinamik endotoksemi modelinde, altı saatlik bir Ang II infüzyonunun, arteriyel kan basıncını geri kazanmada etkili olduğunu ve renal kan akışındaki belirgin bir düşüğe rağmen, idrar çıkışı ve kreatinin klirensini arttığını göstermiştir. Benzer bir modelde anestezi uygulanmış Ang II verilen koyunlarda renal kan akışında eşit bir azalma bildirilmiştir, ancak anjiyotensin II ile tedavi edilen hayvanlarda böbrek iletkenliği daha düşük olmuştur (May ve diğ., 2012). Domuzlarda ekzojen Ang II uygulamasının sistemik ve bölgesel hemodinamik, doku perfüzyonu, inflamatuvar yanıt, pıhtılaşma ve mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki uzun vadeli etkileri değerlendirilmiştir (Correa ve diğ., 2014). Meurer ve diğ.(2018). LPS uygulanan (3 mg/kg, ip, 16 saat) endotoksemik farelerin renin salgılanmasını uyardığını, böbreklerden renin salgısının, başlangıçtaki 1.9 katı kadar arttığını, Nguyen ve diğ. (2018) de, endotokseminin ilk aşamasında, plazma renin konsantrasyonunun yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bizim deneylerimizde de plazmada renin düzeyinin LPS uygulanmasıyla beraber kontrol grubuna göre T1, T2 ve T3 zaman noktasında anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir.

Renin salgılayan hücrelerde, GJ'ler, artan kan basıncı ile ortaya çıkan kan kaynaklı sinyallerin saptanmasına ve çoğaltılmasına katkıda bulunabilir. Böbrek içinde, bu tür sinyallerin, afferent arteriyolün EC'leri tarafından otokrin, parakrin ve endokrin uyarıcılara dönüştürülmesi ve daha sonra renin salgılayan hücrelere iletilmesi gerekir. Bu sistem, JGA'yı oluşturan farklı hücre tiplerinin fonksiyonel olarak uyumlu Cx kanalları ile birbirine bağlanmasını gerektirir. Böbreklerde, Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 ve Cx46 ifade edilir, bunlardan Cx37, Cx40, Cx43 ve Cx45 böbrek damarlarında bulunur (Abed ve diğ., 2014a; Hanner ve diğ., 2010). Cx anlatımı ile böbrekte iltihap oluşumu arasında yakın bir ilişki olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (Abed ve diğ., 2014a; Scheckenbach ve diğ., 2011). Cx37 ve Cx40 anti-inflamatuvar böbrek Cx üyeleri olarak kabul edilirken, Cx43 proinflamatuvar bir şekilde etki eder (Abed ve diğ., 2014a, b). Bununla birlikte, Cx hemikanalları, hem EC'leri hem de düz kas hücreleri tarafından vazomotor tonusun kontrolünde ikincil haberci olan Ca^{+2}

iyonunun da geçişini sağlar (Begandt ve diğ., 2017). Cx43'ün, inflamatuvar hücreler, hasar görmüş tübül hücreleri, interstisyel hücreler, farede hipertensif nefropatinin erken aşamalarında peritübüler ve glomerular kapillerlerin endotellerinde kuvvetli bir şekilde anlatımı yapılır (Toubas ve diğ., 2011). Cx43'ün öncelikli olarak tübül-interstisyel inflamasyonuna dahil olduğu düşünülmektedir (Hillis ve diğ., 1997a). Normal sıçan böbrek epitel hücrelerine LPS uygulanmasının, Cx43 proteininin hem yıkımının (Gerl ve diğ., 2014) hem de anlatımının düzenlenmesinde (Fernandez-Cobo ve diğ., 1998) rolünün bulunduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, diğer bir Cx tipi olan Cx37'nin sağlıklı farelerin böbrek korteksinde bolca üretildiği, kronik böbrek hastalığının deneysel modellerinde önemli miktarda azaldığı belirlenmiştir (Toubas ve diğ., 2011). Kronik böbrek hastalığının Cx43[±] fare modelinde, renal korteks, hücre adezyon belirteçlerinde azalmış monosit infiltrasyonu ve interstisyel renal fibrozise yol açan bir azalma göstermektedir (Abed ve diğ., 2014b).

Son on yılda, inflamatuvar koşullarda Cx proteinleri ve kanalları geniş bir doku ve hücre yelpazesinde yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmalar, Cx proteinlerinin beyin, kalp, kan damarları, karaciğer, bağırsaklar, deri, akciğer ve göz dahil olmak üzere çeşitli organlardaki inflamatuvar süreçlerde önemli rol oynadığını göstermiştir (Glass ve diğ., 2015; Kwak ve diğ., 2002; Maes ve diğ., 2015; Martin ve diğ., 2014; Meens ve diğ., 2015; Saredidine ve diğ., 2009; Scheckenbach ve diğ., 2011). Genetiği değiştirilmiş hayvanlar (Abed ve diğ., 2014b; Markoullis ve diğ., 2012; Parthasarathi ve diğ., 2006; Sagawa ve diğ., 2015; Wong ve diğ., 2006), hemikanal engelleyicileri ve GJ inhibitörleri (Abed ve diğ., 2014b; Chanson ve Kwak, 2007; Deva ve diğ., 2012; Matsue ve diğ., 2006, O'Carroll ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2013c), gibi bir dizi deneysel araç, inflamasyonda Cx sinyalinin dahil edilmesinin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında daha iyi bir fikir edinmeye izin vermiştir. Birçok çalışmada genetik olarak Cx proteinlerini içermeyen hayvanlarda Cx43'ün proinflamatuvar (Abed ve diğ., 2014b; Parthasarathi ve diğ., 2006), Cx32 ve Cx37'nin ise anti-inflamatuvar (Abed ve diğ., 2014b; Frossard ve diğ., 2003; Parthasarathi ve diğ., 2006; Sagawa ve diğ., 2015; Wong ve diğ., 2006) olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler, çeşitli Cx inhibitörleri kullanılan çalışmalarla doğrulanmıştır (Chever ve diğ., 2014; Deva ve diğ., 2012; Froger ve diğ., 2010; Pollok ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2013c; Wright ve diğ., 2009).

Krattinger ve diğ. (2007), GJ'lerde Cx40'ı tanımlayan yeni ve saflaştırılmış antikoları kullanarak, renin üreten hücreleri birleştiren aynı Cx40'ın ayrıca jukstaglomerular afferent

arteriyolün EC'leri tarafından da bol miktarda anlatımının yapıldığını göstermişlerdir. Bolon ve diğ. (2007)'nin yaptığı çalışmada uygulanan LPS'nin, Cx40'ı hedef alan tirozin, Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz (ERK1 / 2), protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz C (PKC)'ye bağlı sinyal yoluyla endoteller arası elektriksel bağlantıyı azalttığı belirlenmiştir.

JGA'nın bütün hücrelerinin, Cx ailesinin diğer birçok üyesinden ziyade Cx40 ile baskın olarak bağlanmasının nedeni bilinmemektedir (Bruzzzone ve Ressot, 1997). Kronik hipertansiyon sırasında endotel ve renin üreten hücreler arasında artan Cx40 anlatımının nedeni ve önemi açıklanmaya devam etmektedir. Yapılan bir çalışmada, Cx40'ın hipertansif vasküler değişikliklerle ilişkili endotel ve böbrek de spesifik bir belirteç olduğu gösterilmiştir. Bu GJ proteininin, RAS'ın kusurlarından kaynaklanan hipertansiyon hastalıklarının patogeneze katkıda bulunma olasılığını artırabileceği ileri sürülmüştür (Krattinger ve diğ., 2007).

Krattinger ve diğ. (2007)'nin yaptığı bir diğer çalışma da farelerin Cx40'a bağlı hipertansiyonun çoğunlukla renin salgılayan hücrelerin sayısındaki ve fonksiyonundaki değişikliklerden ve dolayısıyla RAS'ın aktivasyonundan kaynaklandığını göstermiştir. Veriler, renin salgılayan afferent arteriyollerin jukstaglomerular kısmının miyoepitelyal hücreleri üzerinde birleşen Cx'lerin, bu hücrelerden gelen sinyallerde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Bu verilerin sonucu olarak, salgı sistemlerinin kontrolünde ana oyuncu olarak Cx sinyaline işaret olarak artan kanıtlar renin üreten hücrelere uzanıyor olması ve Cx40'ın JGA'da düzenleyici rol aldığı ileri sürülüyor (Michon ve diğ., 2005; Klee ve diğ., 2005).

Cx kaybının, kan basıncının düzenlenmesini değiştirerek, hipertansiyona yol açan RAS'ı aktive ettiği gösterilmiştir. Cx40'ın eksik olduğu farelerde yapılan çalışmalarda, gerçekleşen hipertansiyonun renin salgılayan hücrelerin sayısında ve renin üretiminde meydana gelen artıştan kaynaklandığı gösterilmiştir (Krattinger ve diğ., 2007)

Genel olarak, Cx'lerin ve kanallarının inflamatuvar süreçte ve dolayısıyla birçok yaygın hastalıkta önemli bir rol oynadığı sonucuna varılabilir. Bu, yeni ilaç hedeflerinin ve inflamatuvar hastalıkların klinik tedavisinde yeni terapötiklerin araştırılması için fırsatlar sağlayabilir.

Bakteriyel endotoksinler ve proinflamatuvar sitokinlerin (örneğin, TNF- α ve interferon gamma-IFN- γ) makrofaj/monosit kültüründe Cx43 anlatımını artırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Jara ve diğ., 1995; Eugenin ve diğ., 2003). Sitoplazmik zara bağlı Cx43

oligomeri, özellikle immün olmayan hücrelerde (kalp, beyin ve vasküler) hücre içi iletişimi kolaylaştırmak için GJ'leri oluşturmak üzere komşu hücreler üzerinde kenetlenen hekzamerik hemikanallar oluşturmak için kullanılır (Unger ve diğ., 1999; Dbouk ve diğ., 2009). Li ve diğ. (2018)'nin yaptığı çalışmada, proinflamatuvar olan serum amiloid A (SAA)'nın doğuştan gelen immün hücrelerde Cx43'ün anlatımını düzenleyip düzenlemediğini ve Cx43 hemikanal girişimlerinin ölümcül endotokseminin sonucunu etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Bu çalışmada Cx43 hemikanalları, aktive edilmiş monositlerden/makrofajlardan (Beyer ve diğ., 1991; Kang ve diğ., 2008) geçici bir ATP salınımı sağladığı ve hemikanal-aracılı ATP akışının, P2X7R reseptörüne bağlı inflamasyon aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Surprenant ve diğ., 1996; Ali ve diğ., 2011). Ayrıca bu çalışma, yeni bir proinflamatuvar olan SAA'nın Cx43 anlatımını artırdığını ve bakteriyel enfeksiyondaki gibi makrofajları uyardığını, Cx43 hemikanalının yaralanma ve enfeksiyona neden olan inflamasyonda patojenik bir rol oynadığını ve protein kinaz R (PKR) fosforilasyonunu/aktivasyonunu tetiklemek için muhtemelen hücre dışı ATP akışını kolaylaştırdığını göstermiştir (Li ve diğ., 2018). Fernandez-Cobo ve diğ. (1999)'nin yaptığı çalışmada, bakteriyel LPS uygulamasından sonra sıçan kalbinde Cx43 mRNA seviyelerinde hızlı bir düşüş olduğu gösterilmiştir. Bu düşüşün LPS kaynaklı inflamasyondan meydana geldiği belirtilmiştir. Kalpte yapılan bu çalışma gibi Cx43'ün regülasyonunun altında yatan mekanizmaların anlaşılması, endotoksemi sırasında böbrekte de gerçekleşen olayların iyileştirilebilmesi için olası tedavilere olanak sağlayabilir.

Bizim çalışmamızda da LPS uygulanarak endotoksemik hale getirilen sıçanlarda meydana gelen hipotansiyon sonucunda RAS'ın aktive olduğu hem böbrek dokusunda hem de kan plazmasında renin seviyesinin arttığı tespit edildi. Buna bağlı olarak, Ang II seviyelerinde doku ve plazmada artmış olduğu görüldü. RAS'ın aktive olmasıyla birlikte Cx40 ve Cx43 proteinlerinin biyokimyasal olarak seviyelerine bakıldığında Cx40 ve Cx43'ün böbrek dokusunda herhangi bir anlamlı değişikliğe uğramadığı, kan plazmasında ise LPS grubundaki seviyelerinde bir miktar azalma olmakta birlikte istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görüldü. Böbrek dokusunda Cx40 ve Cx43 seviyelerinde anlamlı değişikliklerin olmamasının uygulanan LPS'nin doz ve süresinin deney süresince doku bütünlüğünü ve geçit bağlantılarının genel yapısını bozma konusunda yetersiz olabileceği, üretilen Cx'lerinde GJ'lerin yenilenmesi ve RAS'ın düzenlenmesi için GJ'lerde kullanılmış olabileceğinden plazmadaki seviyelerinin azaldığı düşünülmektedir. Daha ayrıntılı olarak böbrek dokusunda immünohistokimyasal

metod ile Cx40 seviyesine ve dağılımlarına baktığımızda Cx40 seviyesinin LPS ve LPS+AA gruplarında azalma görülsede anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi.

Sonuç olarak, çalışmamızda LPS uygulaması ile oluşturulan endotoksemi modelinde kan basıncındaki düşüğe bağlı olarak RAS'ın anlamlı bir şekilde uyarıldığı görülmüştür. AA uygulamasının ise kan basıncı üzerinde etkisinin olmadığı, ancak RAS üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. LPS uygulaması ile oluşturulan endotoksemi modelinde konneksin proteinlerine bakıldığında anlamlı bir değişiklik belirlenememiştir. Sonuç olarak, endotoksemide RAS ile konneksinler arasındaki ilişkinin açıklığa kavuşabilmesi için farklı deneysel modellerde daha fazla araştırılmanın yapılması, RAS'ın patofizyolojik olaylardaki rolünün anlaşılmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abed, A., Dussaule, J.C., Boffa, J.J., 2014a, Connexins in renal endothelial function and dysfunction, *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, 14:15-21.
- Abed, A., Toubas, J., Kavvadas, P., 2014b, Targeting connexin 43 protects against the progression of experimental chronic kidney disease in mice, *Kidney International*, 86:768-79.
- Ali, N. A., O'Brien Jr, J.M., Dungan, K., Phillips, G., Marsh, C.B., Lemeshow, S., Preiser, J.C., 2008, Glucose variability and mortality in patients with sepsis, *Critical CMedicine*, 36(8), 2316.
- Ali, S.R., Timmer, A.M., Bilgrami, S., Park, E.J., Eckmann, L., Nizet, V., Karin, M., 2011, Anthrax toxin induces macrophage death by p38 MAPK inhibition but leads to inflammasome activation via ATP leakage, *Immunity*, 35(1), 34-44.
- Andersen, O., Haugaard, S.B., Jørgensen, L.T., Sørensen, S., Nielsen, J.O., Madsbad, S., Iversen, J., 2003, Preanalytical handling of samples for measurement of plasma lactate in HIV patients, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 63(6), 449-454.
- Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guincestre, M.C., and Guidet, B., 2003, Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network, *American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine*, 168.2:165-172.
- Arensbak, B., Mikkelsen, H.B., Gustafsson, F., Christensen, T., Holstein-Rathlou, N.H., 2001, Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles, *Histochemistry and Cell Biology*, 115(6), 479-487.
- Armour, J., Tyml, K., Lidington, D., Wilson, J.X., 2001, Ascorbate prevents microvascular dysfunction in the skeletal muscle of the septic rat, *Journal of Applied Physiology*, 90: 795-803.
- Bánhegyi, G. and Mandl, J., 2001, The hepatic glycogenoreticular system, *Pathology Oncology Research*, 7: 107–110.
- Bánhegyi, G., Garzó, T., Antoni, F., Mandl, J., 1988, Glycogenolysis – and not gluconeogenesis – is the source of UDP-glucuronic acid for glucuronidation, *Biochim Biophys Acta*, 967: 429-435
- Barajas, L., Liu, L., Tucker, M., 1994, Localization of connexin 43 in the rat kidney, *Kidney International*, 46: 621-626.
- Bartlett, I.S., Steven, S., Segal, 2000, Resolution of smooth muscle and endothelial pathways for conduction along hamster cheek pouch arterioles, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 278.2:H604-H612.

- Begandt, D., Good, M.E., Keller, A.S., DeLalio, L.J., Rowley, C., Isakson, B.E., Figueroa, X.F., 2017, Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation, *BMC Cell Biology*, 18(1), 2.
- Bell, P.D., Lapointe, J.Y., Peti-Peterdi, J., 2003, Macula densa cell signaling, *Annual Review of Physiology*, 65(1), 481-500.
- Bennett, M. and Zukin, R.S., 2004, Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain, *Neuron*, 41: 495–511
- Berend, K., Van Hulsteijn, L.H., Gans, ROB., 2012, Chloride: the queen of electrolytes?, *European Journal of Internal Medicine*, 2012;23(3):203–11.
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Fischbeck, K.H., 1993, Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease, *Science*, 262(5142), 2039-2042.
- Beyer, E.C. and Berthoud, V.M., 2018, Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(1), 5-8.
- Beyer, E.C. and Steinberg, T.H., 1991, Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 7971-7974
- Beyer, E.C., Paul, D.L., Goodenough, D.A., 1987, Connexin 43: a protein from rat heart homologous to the gap junction protein from liver, *The Journal of Cell Biology*, 105: 2621-2629.
- Biava, C., M., West, 1966, Fine structure of normal human juxtaglomerular cells. I. General structure and intercellular relationships, *The American Journal of Pathology*, 49.4 679.
- Biesalski, H.K., McGregor, G.P., 2007, Antioxidant therapy in critical care—is the microcirculation the primary target?, *Critical Care Medicine*, 35:S577-83.
- Boll, H.U., Forssmann, W.G., Taugner, R., 1975, Studies on the juxtaglomerular apparatus. IV. Freeze-fracturing of membrane surfaces, *Cell And Tissue Research*, 161.4:459-469.
- Bolon, M.L., Kidder, G.M., Simon, A.M., Tyml, K., 2007, Lipopolysaccharide reduces electrical coupling in microvascular endothelial cells by targeting connexin40 in a tyrosine-, ERK1/2-, PKA-, and PKC-dependent manner, *Journal of Cellular Physiology*, 211, 159-166.
- Braunstein, S., Badura, M.L., Xi, Q., Formenti, S.C., Schneider, R.J., 2009, Regulation of protein synthesis by ionizing radiation, *Molecular and Cellular Biology*, 29(21), 5645-5656.
- Briggs, J.P. and Schnermann, J., 1987, The tubuloglomerular feedback mechanism: functional and biochemical aspects, *Annual Review of Physiology*, 49(1), 251-273.

- Bruzzone, R. and Ressot, C., 1997, Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system, *European Journal of Neuroscience*, 9(1), 1-6.
- Bucher, M., Hobbhahn, J., Kurtz, A., 2001a, Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis, *Critical Care Medicine*, 29:1750-5.
- Bucher, M., Ittner, K.P., Hobbhahn, J., Taeger, K., Kurtz, A., 2001b, Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis, *Hypertension*, 38:177-82.
- Buettner, G.R. and Jurkiewicz, B.A., 1996, Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid, *Radiation Research*, 145: 532-541.
- Busse, R. And Fleming, I., 2003, Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces, *Trends in Pharmacological Sciences*, 24.1:24-29.
- Buzsáki, G., and Chrobak, J.J., 1995, Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks, *Current Opinion in Neurobiology*, 5(4), 504-510.
- Bührle, C.P., Scholz, H., Hackenthal, E., Nobiling, R., Taugner, R., 1986, Epithelioid cells: membrane potential changes induced by substances influencing renin secretion, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 45(1), 37-47.
- Carr, A.C., Shaw, G.M., Fowler, A.A., Natarajan, R., 2015, Ascorbate-dependent vasopressor synthesis: a rationale for vitamin C administration in severe sepsis and septic shock?, *Critical Care*, 19:418.
- Casellas, D., Bouriquet, N., Moore, L.C., 1997, Branching patterns and autoregulatory responses of juxtamedullary afferent arterioles, *American Journal of Physiology*, 272:F416-F421.
- Chanson, M., Kwak, B.R., 2007, Connexin37: a potential modifier gene of inflammatory disease, *Journal of Molecular Medicine*, 85:787-95.
- Chever, O., Lee, C.Y., Rouach, N., 2014, Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission, *Journal of Neuroscience*, 34:11228-32.
- Christ, G.J., Spray, D.C., El-Sabban, M., Moore, L.K., Brink, P.R., 1996, Gap junctions in vascular tissues: evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone, *Circulation Research*, 79(4), 631-646.
- Constable, P.D., 2007, General Medicine, *Veterinary Medicine Ed Radostits OM. 10th ed. Salinders USA*. 51-58
- Cooper, D., Herbertson, M., Werner, H., 1993, Bicarbonate does not increase left ventricular contractility during L-lactic acidemia in pigs, *American Review of Respiratory Disease*, 148:317-322.

- Coppen, S.R., Kodama, I., Boyett, M.R., Dobrzynski, H., Takagishi, Y., Honjo, H., Severs, N.J., 1999, Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(7), 907-918.
- Coppen, S.R., Severs, N.J., Gourdie, R.G., 1999, Connexin45 ($\alpha 6$) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart, *Developmental Genetics*, 24(1-2), 82-90.
- Correa, T.D., Jeger, V., Pereira, A.J., Takala, J., Djafarzadeh, S., Jakob, S.M., 2014, Angiotensin II in septic shock: effects on tissue perfusion, organ function, and mitochondrial respiration in a porcine model of fecal peritonitis, *Critical Care Medicine*, 42:e550-9.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H.C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Nedergaard, M., 1998, Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15735-15740.
- Cuesta, J.M. and Singer M., 2012, The stress response and critical illness: a review, *Critical Care Medicine*, 40:3283-9.
- Çobaner, N., 2017, sıçanlarda LPS ile oluşturulmuş sepsis modelinde astaksantin karaciğer dokusunda antiinflamatuvar etkilerinin araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı.
- Dbouk, H.A., Mroue, R.M., El-Sabban, M.E., Talhouk, R.S., 2009, Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Communication and Signaling*, 7(4), 4-7.
- De Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., & Unger, T.H., 2000, International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors, *Pharmacological Reviews*, 52.3:415-472.
- de Wit, C., Roos, F., Bolz, S.S., Kirchhoff, S., Krüger, O., Willecke, K., Pohl, U., 2000, Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice, *Circulation Research*, 86(6), 649-655.
- De, A.M., Analbers, L., Jongasma, H.J., Gros, D., 1993, Immunoelectron microscopic visualization of the gap junction protein connexin 40 in the mammalian heart, *European Journal of Morphology*, 31(1-2), 51-54.
- Deva, N.C., Zhang, J., Green, C.R., Danesh-Meyer, H.V., 2012, Connexin43 modulation inhibits scarring in a rabbit eye glaucoma trabeculectomy model, *Inflammation*, 35:1276-86.
- Dhein, S., 1998, Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation, *Trends in Pharmacological Sciences*, 19:229-241.

- Doerschug, K.C., Delsing, A.S., Schmidt, G.A., Ashare, A., 2010, Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis, *Critical Care*, 14:R24.
- Dostal D.E. and Baker K.M., 1999, The cardiac renin-angiotensin system: Conceptual, or a regulator of cardiac function?, *Circulation Research*, 85: 643-50.
- Du Cheyron, D., Lesage, A., Daubin, C., Ramakers, M., Charbonneau, P., 2003, Hyperreninemic hypoaldosteronism: a possible etiological factor of septic shock-induced acute renal failure, *Intensive Care Medicine*, 29(10), 1703-1709.
- Dungan, K.M., Braithwaite, S.S., Preiser, J.C., 2009, Stress hyperglycaemia, *Lancet*, 373: 1798-807.
- Dzau VJ., 1988, Tissue renin-angiotensin systems: Physiologic and pharmacological implications, *Circulation*, 77 (Suppl I): 11-3.
- Ebihara, L., 2003, New roles for connexons, *Physiology*, 18.3:100-103.
- Emerson, Geoffrey, G., Steven, S., Segal., 2000, Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control, *Circulation Research* 87,6:474-479.
- Ergin, B., Zuurbier, C.J., Bezemer, R., Kandil, A., Almac, E., Demirci, C., Ince, C., 2015, Ascorbic acid improves renal microcirculatory oxygenation in a rat model of renal I/R injury, *Journal of Translational Internal Medicine*, 3(3), 116-125.
- Erwin, B.L., Denaburg, M.A., Barker, A.B., McArdle, P.J., Windham, S.T., Morgan, C.J., 2017, Evaluation of Vasopressin for Septic Shock in Patients on Chronic Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors, *Critical Care Medicine*, 45(12), e1226-e1232.
- Eugenin, E.A., Branes, M.C., Berman, J.W., Saez, J.C., 2003, TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses, *The Journal of Immunology*, 170, 1320-1328.
- Evans, W.H. and Boitano, S., 2001, Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication, *Biochemical Society Transactions*, 29(3), A56-A56, 606-612.
- Evans, W.H., De Vuyst, E., Leybaert, L., 2006, The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight, *Biochemical Journal*, 397:1-14.
- Fernandez-Cobo, M., Gingalewski, C., De Maio, A., 1998, Expression of the connexin 43 gene is increased in the kidneys and the lungs of rats injected with bacterial lipopolysaccharide, *Shock*, 10:97-102.
- Fernandez-Cobo, M., Gingalewski, C., Drujan, D., and De Maio, A., 1999, Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation, The role of tumour necrosis Factor, *Cytokine*, 11(3), 216-224.

- Figuroa, X.F., Paul, D.L., Simon, A.M., Goodenough, D.A., Day, K.H., Damon, D.N., & Duling, B.R., 2003, Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo, *Circulation Research*, 92.7:793-800.
- Finfer, S., Chittock, D.R., Su, S.Y., Blair, D., Foster, D., Dhingra, V., Bellomo, R., Cook, D., Dodek, P., Henderson, W.R., 2009, Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients, *New England Journal of Medicine*, 360:1283-1297.
- Fisher, B.J., Kraskauskas, D., Martin, E.J., Farkas, D., Puri, P., Massey, H.D., 2014, Attenuation of sepsis-induced organ injury in mice by vitamin C, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 38:825-839.
- Fisher, B.J., Kraskauskas, D., Martin, E.J., Farkas, D., Weglin, J.A., Brophy, D., 2012, Mechanisms of attenuation of abdominal sepsis induced acute lung injury by ascorbic acid, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303:L20-L32.
- Fisher, B.J., Seropian, I.M., Masanori, Y., Kraskauskas, D., Voelkel, N.F., Fowler, A. A., 2011, Ascorbic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury, *Critical Care Medicine*, 39:1454-1460.
- Fricker, D. and Miles, R., 2001, Interneurons, spike timing, and perception, *Neuron*, 32: 771-774.
- Froger, N., Orellana, J.A., Calvo, C.F., 2010, Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45:37-46.
- Frossard, J.L., Rubbia-Brandt, L., Wallig, M.A., 2003, Severe acute pancreatitis and reduced acinar cell apoptosis in the exocrine pancreas of mice deficient for the Cx32 gene, *Gastroenterology*, 124:481-93.
- Gabbe, E., 1934, Bestimmung Von Vitamin C im Blutserum, *Klinische Wochenschrift*, 13:1389-92.
- Galley, H.F., Davies, M.J., Webster, N.R., 1996, Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading, *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 139-143.
- Ganesh, K., Sharma, R.N., Varghese, J., Pillai, M.G.K., 2016, A profile of metabolic acidosis in patients with sepsis in an Intensive Care Unit setting, *International journal of Critical Illness and Injury Science*, 6(4), 178.
- Gerl, M., Kurt, B., Kurtz, A., Wagner, C., 2014, Connexin 43 is not essential for the control of renin synthesis and secretion, *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 466:1003-9.
- Gilchrist, Robert, B., Michelle Lane, and Jeremy, G., Thompson, 2008, Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality, *Human Reproduction Update*, 14.2:159-177.

- Gil-de-Gómez, L., Astudillo, A.M., Lebrero, P., Balboa, M.A., ve Balsinde, J., 2017, Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release, *Frontiers in Immunology*, 8, 1251.
- Glass, A.M., Snyder, E.G., Taffet, S.M., 2015, Connexins and pannexins in the immune system and lymphatic organs, *Cell Molecular Life Science*, 72:2899-910.
- Goligorsky, M.S., Iijima, K., Krivenko, Y., Tsukahara, H., Hu, Y., Moore, L.C., 1997, Role of mesangial cells in macula densa to afferent arteriole information transfer, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 24(7), 527-531.
- Gómez, H. and Kellum, J.A., 2019, Sepsis-induced acute kidney injury, In *Critical Care Nephrology*, pp. 524-533.
- Goode, H.F. and Webster, N.R., 1993, Free radicals and antioxidants in sepsis, *Critical Care Medicine*, 21: 1770-1776.
- Gros, D., Jarry-Guichard, T., Ten Velde, I., De Mazière, A.M.G. L., van Kempen, M.J., Davoust, J., Jongsma, H.J., 1994, Restricted distribution of connexin40, a gap junctional protein, in mammalian heart, *Circulation Research*, 74(5), 839-851.
- Gros, D.B. and Jongsma, H.J., 1996, Connexins in the mammalian heart function, *Bioessays*, 18:719-730.
- Gustafsson, F., Holstein-Rathlou, N.H., 1999, Conducted vasomotor responses in arterioles: characteristics, mechanisms and physiological significance, *Acta Physiologica Scandinavica*, 167.1:11-21.
- Gustafsson, F., Mikkelsen, H.B., Arensbak, B., Thuneberg, L., Neve, S., Jensen, L J., Holstein-Rathlou, N.H., 2003, Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries, *Histochemistry and Cell Biology*, 119(2), 139-148.
- Guyton, A.C., Coleman, T.G., Granger, H.J., 1972, Circulation: overall regulation, *Annual Review of Physiology*, 34(1), 13-44.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2007, *Dolaşım Şoku ve Şok Tedavisinin Fizyolojisi*, Tıbbi Fizyoloji, Çeviri Editörleri: Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.C., Bölüm 24, Nobel Tıp Kitapevleri, 978-975-420-558-9, 278-287.
- Haddock, R.E., Grayson, T.H., Brackenbury, T.D., Meaney, K.R., Neylon, C.B., Sandow, S.L., Hill, C.E., 2006, Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291.5:H2047-H2056.
- Haefliger, J. A., Krattinger, N., Martin, D., Pedrazzini, T., Capponi, A., Döring, B., Meda, P., 2006, Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension, *The Journal of Clinical Investigation*, 116(2), 405-413.121.

- Haefliger, J.A., Demotz, S., Braissant, O., 2001, Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension, *Kidney International*, 60:190-201.
- Haefliger, J.A., Nicod, P., Meda, P., 2004, Contribution of connexins to the function of the vascular Wall, *Cardiovascular Research*, 62:345-356.
- Hall, J.E., 2001, Historical Perspective of the Renin–Angiotensin System, *Angiotensin Protocols*, Humana Press., 3-21.
- Hanner, F., Sorensen, C.M., Holstein-Rathlou, N.H., Peti-Peterdi, J., 2010, Connexins and the kidney, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298:R1143-55.
- Hanner, F., von Maltzahn, J., Maxeiner, S., Toma, I., Sipos, A., Kruger, O., Peti-Peterdi, 2008, Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295.2:R371-R380.
- Hansell, P., Welch, W.J., Blantz, R.C., & Palm, F., 2013, Determinants of kidney oxygen consumption and their relationship to tissue oxygen tension in diabetes and hypertension, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 40(2), 123-137.
- Hansen, P.B., Jensen, B.L., Andreasen, D., Skøtt, O., 2001, Differential expression of T- and L-type voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels, *Circulation Research*, 89(7), 630-638.
- Hillis, G.S., Duthie, L.A., Brown, P.A., 1997a, Upregulation and co-localization of connexin43 and cellular adhesion molecules in inflammatory renal disease, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 182:373-9.
- Hillis, G.S., Duthie, L.A., Mlynski, R., McKay, N.G., Mistry, S., MacLeod, A.M., Haites, N.E., 1997b, The expression of connexin 43 in human kidney and cultured renal cells, *Nephron*, 75(4), 458-463.
- Holstein-Rathlou, N.H. and Marsh, D.J., 1989, Oscillations of tubular pressure, flow, and distal chloride concentration in rats, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 256(6 Part 2):F1007-F1014.
- Hong, T. and Hill, C.E., 1998, Restricted expression of the gap junctional protein connexin 43 in the arterial system of the rat, *The Journal of Anatomy*, 192:583-593.
- Huckabee, W.E., 1961, Abnormal resting blood lactate. II. Lactic acidosis, *The American Journal of Medicine*, 30:840-848.
- Hwan, S.K. and Beyer, E.C., 2000, Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature, *Microvascular Research*, 59:140-148
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., 2005, Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure, *Nature*, 436:112-6.

- Ince, C., Mayeux, P.R., Nguyen., T., Gomez, H., Kellum, J.A., Ospina-Tascón. G.A., 2016, The endothelium in sepsis, *Shock (Augusta, Ga)*, 45:259-70.
- Inscho, E.W., 2001, Renal microvascular effects of P2 receptor stimulation, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28:332-339.
- Inscho, E.W., Cook, A.K., Imig, J.D., Vial, C., Evans, R.J., 2003, Physiological role for P2X 1 receptors in renal microvascular autoregulatory behavior, *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1895-1905.110.
- Inscho, E.W., Mitchell, K.D., Navar, L.G., 1994, Extracellular ATP in the regulation of renal microvascular function, *The FASEB Journal*, 8: 319-328.
- Jara, P.I., Boric, M.P., Saez, J.C., 1995, Leukocytes express connexin 43 after activation with lipopolysaccharide and appear to form gap junctions with endothelial cells after ischemia-reperfusion, *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 92, 7011-7015.
- Jensen, B.L., Friis, U.G., Hansen, P.B., Andreasen, D., Uhrenholt, T., Schjerning, J., Skøtt, O., 2004, Voltage-dependent calcium channels in the renal microcirculation, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(6), 1368-1373.
- Jiang, J.X. and Gu, S., 2005, Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711:208-214.
- Just A., 2007, Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292: R1-R17.
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., and Nedergaard, M., 2008, Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP, *Journal of Neuroscience*, 28(18), 4702-4711.
- Kellum, J.A., Bellomo, R., Kramer, D.J., 1998, Etiology of metabolic acidosis during saline resuscitation in endotoxemia, *Shock*, 9:364-368.
- Kellum, J.A., Song, M., Venkataraman, R., 2004, Effects of hyperchloremic acidosis on arterial pressure and circulating inflammatory molecules in experimental sepsis, *Chest*, 125(1), 243-248.
- Klee, P., Boucard, N., Caille, D., Cancela, J., Charollais, A., Charpantier, E., Zulianello, L., 2005, Connexin modulators of endocrine function, *In Gap Junctions in Development and Disease*, 197-221.
- Klein, N., Gembarde, F., Supe, S., 2013, Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury, *Critical Care Medicine*, 41:e334-43.
- Krattinger, N., Capponi, A., Mazzolai, L., Aubert, J.F., Caille, D., Nicod, P., Haefliger, J.A., 2007, Connexin40 regulates renin production and blood pressure, *Kidney International*, 72(7), 814-822..

- Kruger, O., Plum, A., Kim, J.S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Willecke, K., 2000, Defective vascular development in connexin 45-deficient mice, *Development*, 127(19), 4179-4193.
- Krutovskikh, V. and Yamasaki, H., 2000, Connexin gene mutations in human genetic diseases, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462: 197-207.
- Kuhn, S.O., Meissner, K., Mayes, L.M., Bartels, K., 2018, Vitamin C in sepsis, *Current Opinion in Anesthesiology*, 31(1), 55-60.
- Kurtz, A., Penner, R., 1989, Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86:3423-3427.
- Kurtz, L., Schweda, F., de Wit, C., Kriz, W., Witzgall, R., Warth, R., Wagner, C., 2007, Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium, *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(4), 1103-1111.
- Kwak, B.R., Mulhaupt, F., Veillard, N., Gros, D.B., Mach, F., 2002,. Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(2), 225-230.
- Lagaud, G., Karicheti, V., Knot, H.J., Christ, G.J., Laher, I., 2002, Inhibitors of gap junctions attenuate myogenic tone in cerebral arteries, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(6), H2177-H2186.
- Laird, D.W., 2005, Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711:172-182.
- Laird, D.W., 2006, Life cycle of connexins in health and disease, *Biochemical Journal*, 394.3:527-543.
- Legrand, M., Bezemer, R., Kandil, A., Demirci, C., Payen, D., Ince, C., 2011, The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats. *Intensive Care Medicine*, 37(9), 1534-1542.
- Leithe, E. and Rivedal, E., 2004, Epidermal growth factor regulates ubiquitination, internalization and proteasome-dependent degradation of connexin43, *Journal Cell Science.*, 117(Pt 7):1211-20.
- Leone, M., Asfar, P., Radermacher, P., Vincent, J.L., Martin, C., 2015, Optimizing mean arterial pressure in septic shock: a critical reappraisal of the literature, *Critical Care*, 19(1), 101.
- Lepper, P.M., Ott, S., Nuesch, E., von Eynatten, M., Schumann, C., Pletz, M.W., Mealing, N.M., Welte, T., Bauer, T.T., Suttorp, N., Jüni, P., Bals, R., Rohde, G., 2012, Serum glucose levels for predicting death in patients admitted to hospital for community acquired pneumonia: prospective cohort study, *British Medical Journal*, 344: e3397.

- Levy, B., Mansart, A., Bollaert, P.E., Franck, P., Mallie, J.P., 2003, Effects of epinephrine and norepinephrine on hemodynamics, oxidative metabolism, and organ energetics in endotoxemic rats, *Intensive Care Medicine*, 29(2), 292-300.
- Li, W., Bao, G., Chen, W., Qiang, X., Zhu, S., Wang, S., Yang, H., 2018, Connexin 43 hemichannel as a novel mediator of sterile and infectious inflammatory diseases, *Scientific Reports*, 8(1), 166.
- Liao, Y., Day, K.H., Damon, D.N., Duling, B.R., 2001, Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9989-9994.
- Liu, X.Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M.J.T., Steel, K.P., Brown, S.D., 1997, Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness, *Nature Genetics*, 16(2), 188.
- Loewenstein, W.R., Rose, B., 1992, The cell-cell channel in the control of growth, In *Seminars in Cell Biology*, Vol. 3, No. 1, pp. 59-79.
- Lund, D.D., Brooks, R.M., Faraci, F.M., Heistad, D.D., 2007, Role of angiotensin II in endothelial dysfunction induced by lipopolysaccharide in mice, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293:H3726-31.
- Maes, M., Yanguas, S.C., Willebrords, J., Cogliati, B., Vinken, M., 2015, Connexin and pannexin signaling in gastrointestinal and liver disease, *Translational Research*, 166(4), 332-343.
- Makris, K. and Spanou, L., 2016, Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes, *The Clinical Biochemist Reviews*, 37(2), 85.
- Mandl, J., Szarka, A., Bánhegyi, G., 2009, Vitamin C: update on physiology and pharmacology, *British Journal of Pharmacology*, 157:1097-110.
- Marik, P.E., 2018, Vitamin C for the treatment of sepsis: the scientific rationale, *Pharmacology & Therapeutics*. 63-70.
- Marik, P.E., Khangoora, V., Rivera, R., Hooper, M.H., Catravas, J., 2017, Hydrocortisone, Vitamin C, and Thiamine for the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock: A Retrospective Before-After Study, *Chest.*, 151:1229-38.
- Markoullis, K., Sargiannidou, I., Gardner, C., Hadjisavvas, A., Reynolds, R., Kleopa, K.A., 2012, Disruption of oligodendrocyte gap junctions in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Glia*, 60(7), 1053-1066.
- Marks, L.S. and Maxwell, M.H., 1979, Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note, *Hypertension*, 1.4:384-388.
- Martin, P.E., Blundell, G., Ahmad, S., Errington, R.J., Evans, W.H., 2001, Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels, *Journal of Cell Science*, 114(21), 3845-3855.

- Martin, P.E., Easton, J.A., Hodgins, M.B., Wright, C.S., 2014, Connexins: sensors of epidermal integrity that are therapeutic targets, *FEBS Lett* 588:1304-14.
- Matsue, H., Yao, J., Matsue, K., Nagasaka, A., Sugiyama, H., Aoki, R., Shimada, S., 2006, Gap junction-mediated intercellular communication between dendritic cells (DCs) is required for effective activation of DCs, *The Journal of Immunology*, 176(1), 181-190.
- May, C.N., Ishikawa, K., Wan, L., 2012, Renal bioenergetics during early gramnegative mammalian sepsis and angiotensin II infusion, *Intensive Care Medicine*, 38:886-93.
- May, J.M. and Harrison, F.E., 2013, Role of vitamin C in the function of the vascular endothelium, *Antioxid Redox Signal*, 19:2068-2083
- McGuire, J.J., Ding, H., Triggle, C.R., 2001, Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor (s), *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 79(6), 443-470.
- Meda, P., Chanson, M., Pepper, M., Giordano, E., Bosco, D., Traub, O., Orci, L., 1991, In vivo modulation of connexin 43 gene expression and junctional coupling of pancreatic B-cells, *Experimental Cell Research*, 192(2), 469-480.
- Meens, M.J., Kwak, B.R., Duffy, H.S., 2015, Role of connexins and pannexins in cardiovascular physiology, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72:2779-92.
- Mete, B., 2006, Sepsiste böbrek ve karaciğer, *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Güncel Bilgiler Işığında Sepsis Sempozyumu Bildirisi*, 51:35-43.
- Meurer, M., Ebert, K., Schweda, F., and Höcherl, K., 2018, The renal vasodilatory effect of prostaglandins is ameliorated in isolated-perfused kidneys of endotoxemic mice, *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 470 (11), 1691-1703.
- Michon, L., Nlend, R., Bavamian, S., 2005, Involvement of gap junctional communication in secretion, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1719: 82-101.
- Montoro, R.J., Yuste. R., 2004, Gap junctions in developing neocortex: a review, *Brain Research Reviews*, 47: 216–226.
- Moore, L.C., Casellas, D., Persson, A.E., Müller-Suur, R., and Morsing, P., 1990, Renal hemodynamic regulation by the renin-secreting segment of the afferent arteriole, *Kidney International, Supplement*, 30, S65-8.
- Musil, L.S., Goodenough, D.A., 1993, Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER, *Cell*, 74.6:1065-1077.
- Nagy, J.I., Dudek, F.E., Rash, J.E., 2004, Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system, *Brain Research Reviews*, 47(1-3), 191-215.

- Navar, L.G., Inscho, E.W., Majid, S.A., Imig, J.D., Harrison-Bernard, L.M., Mitchell, K.D., 1996, Paracrine regulation of the renal microcirculation, *Physiological Reviews*, 76(2), 425-536.
- Nguyen, M., Denimal, D., Dargent, A., Guinot, P. G., Duvillard, L., Quenot, J. P., and Bouhemad, B., 2018, Plasma Renin Concentration is Associated with Hemodynamic Deficiency and Adverse Renal Outcome in Septic Shock, *Shock (Augusta, Ga.)*.
- Nishiyama, A., Rahman, M., Inscho, E.W., 2004, Role of interstitial ATP and adenosine in the regulation of renal hemodynamics and microvascular function, *Hypertension Research*, 27:791-804.
- O'Carroll, S.J., Alkadhi, M., Nicholson, L.F., Green, C.R., 2008, Connexin 43 mimetic peptides reduce swelling, astrogliosis, and neuronal cell death after spinal cord injury, *Cell Communication & Adhesion*, 15:27-42.
- Okamoto, T. and Suzuki, K., 2017, The Role of Gap Junction-Mediated Endothelial Cell–Cell Interaction in the Crosstalk between Inflammation and Blood Coagulation, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2254.
- Opie, L. 1965, Effect of extracellular pH on function and metabolism of isolated perfused rat heart, *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 209:1975-1980.
- Oudemans-van Straaten, H.M., Spoelstra-de Man, A.M. de Waard, M.C., 2014, Vitamin C revisited, *Critical Care*, 18:460.
- Palma, L.C., Ferreira, G.F., Amaral, Brauer, L., Azevedo, L.C.P., Park, M., 2003, Acidosis and mortality in severe sepsis and septic shock evaluated by base excess variation, *Critical Care*, 7:39.
- Palsson-Mcdermott, E.M., O'neill, L.A.J., 2004, Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4, *Immunology*, 113:153-62.
- Panchin, Y.V., 2005, Evolution of gap junction proteins—the pannexin alternative, *Journal of Experimental Biology*, 208(8), 1415-1419.
- Parthasarathi, K., Ichimura, H., Monma, E., 2006, Connexin 43 mediates spread of Ca₂⁺-dependent proinflammatory responses in lung capillaries, *The Journal of Clinical Investigation*, 116:2193-200.
- Pawar, R.D., Patole, P.S., Wörnle, M., Anders, H.J., 2006, Microbial nucleic acids pay a Toll in kidney disease, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291(3):509-16.
- Pedoto, A., Caruso, J.E., Nandi, J., 1999, Acidosis stimulates nitric oxide production and lung damage in rats, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159:397-402.
- Penuela, S., Bhalla, R., Gong, X.Q., Cowan, K.N., Celetti, S.J., Cowan, B.J., Laird, D.W., 2007, Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics

- from the connexin family of gap junction proteins, *Journal of Cell Science*, 120(21), 3772-3783.
- Peti-Peterdi, J., 2006, Calcium wave of tubuloglomerular feedback., *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291: 473-480.
- Peti-Peterdi, J., Morishima, S., Bell, P.D., and Okada, Y., 2002, Two-photon excitation fluorescence imaging of the living juxtaglomerular apparatus, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 283: F197-F201.
- Phelan, P., 2005, Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1711.2:225-245.
- Pollok, S., Pfeiffer, A.C., Lobmann, R., 2011, Connexin 43 mimetic peptide Gap27 reveals potential differences in the role of Cx43 in wound repair between diabetic and nondiabetic cells, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15:861-73
- Quilley, C.P., Lin, Y.R., McGiff, J.C., 1993, Chloride anion concentration as a determinant of renal vascular responsiveness to vasoconstrictor agents, *British Journal of Pharmacology*, 108(1):106-10.
- Rackauskas, M., Kreuzberg, M.M., Pranevicius, M., Willecke, K., Verselis, V.K., Bukauskas, F.F., 2007, Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45, *Biophysical Journal*, 92(6), 1952-1965.
- Rahman, S., Carlile, G., Evans, W.H., 1993, Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies, *Journal of Biological Chemistry*, 268:1260-1265.
- Ramkumar, N., Kohan, D.E., 2016, Role of the collecting duct renin angiotensin system in regulation of blood pressure and renal function, *Current Hypertension Reports*, 18.4:29.
- Rehm, M., Orth, V., Scheingraber, S., 2000, Acid-base changes caused by 5% albumin versus 6% hydroxyethyl starch solution in patients undergoing acute normovolemic hemodilution: a randomized prospective study, *Anesthesiology*, 93:1174-1183.
- Ren, Y., Carretero, O.A., Garvin, J.L., 2002, Role of mesangial cells and gap junctions in the tubuloglomerular feedback, *Kidney International*, 62:525-531.
- Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., Ressler, J., Muzzin, A., Knoblich, B., 2001, Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock, *New England Journal of Medicine*, 345:1368-77.
- Rolih, C.A. and Ober, K.P., 1995, The endocrine response to critical illness, *Medical Clinics of North America*, 79:211-24.
- Rummery, N.M., Hill, C.E., 2004, Vascular gap junctions and implications for hypertension, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31.10:659-667.

- Russ U., Rauch U., Quast U., 1999, Pharmacological evidence for a KATP channel in renin-secreting cells from rat kidney, *The Journal of Physiology*, 517:781-790.
- Sáez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., Beyer, E.C., 2003, Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions, *Physiological Reviews*, 83(4), 1359-1400.
- Saez, J.C., Connor, J.A., Spray, D.C., Bennett, M.V. , 1989, Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1, 4, 5-trisphosphate, and to calcium ions, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2708-2712.
- Sagawa, H., Naiki-Ito, A., Kato, H., 2015, Connexin 32 and luteolin play protective roles in non-alcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, 36:1539-49.
- Salvemini, D., and Cuzzocrea, S., 2002, Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation, *Free Radical Biology and Medicine*, 33.9:1173-1185.
- Salvo, I., de Cian, W., Musicco, M., 1995, The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock, *Intensive Care Medicine*, 21: S244-9.
- Sandow, S.L., Bramich, N.J., Bandi, H.P., Rummery, N.M., Hill, C.E., 2003, Structure, function, and endothelium-derived hyperpolarizing factor in the caudal artery of the SHR and WKY rat, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(5), 822-828.
- Sandow, S.L., Neylon, C.B., Chen, M.X., Garland, C.J., 2006, Spatial separation of endothelial small-and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (KCa) and connexins: possible relationship to vasodilator function?, *Journal of Anatomy*, 209(5), 689-698.
- Sandow, S.L., Tare, M., Coleman, H.A., Hill, C.E., Parkington, H.C., 2002, Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor, *Circulation Research*, 90(10), 1108-1113.
- Sarieddine, M.Z., Scheckenbach, K.E., Foglia, B., 2009, Connexin43 modulates neutrophil recruitment to the lung, *Journal of Cellular and Molecular Medicine.*, 13:4560-70.
- Schaller, M.D., Waeber, B., Nussberger, J., Brunner, H.R., 1985, Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia, *Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 249:H1086-92.
- Scheckenbach, K.E., Crespín, S., Kwak, B.R., Chanson, M., 2011, Connexin channel-dependent signaling pathways in inflammation, *Journal of Vascular Research*, 48:91-103.
- Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O., and Kurtz, A., 2007, Renin release, *Physiology*, 22(5), 310-319.
- Schwiebert, E.M., 2001, ATP release mechanism ATP receptors and purinergic signalling along the nephron, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 28: 340-350.

- Segal, S.S., and Duling, B.R., 1987, Propagation of vasodilation in resistance vessels of the hamster: development and review of a working hypothesis, *Circulation Research*, 61:II20-II25.
- Seul, K.H., and Beyer, E.C., 2000, Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature, *Microvascular Research*, 59.1:140-148.
- Shigeki K., Satoshi G., Daizoh S., Toshihiko M., Hiroshi O., Seitaro F., Tsunetoshi A., Hiroto I., Joji K., Y., Shin-ichiro S., Koichiro S., Yasushi S., Naoshi T., Kiyotsugu T., Ryosuke T., Yoshihiro Y., Norio Y. and Naoki A., 2015, Impact of serum glucose levels on disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis, *Acute Medicine & Surgery*, 2: 21-28.
- Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S., 2010, The bacterial cell envelope, *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 2(5), a000414.
- Silva, E., Passos, R., da H, Ferri, M.B., de Figueiredo, L.F., 2008, Sepsis: from bench to bedside, *Clinics (Sao Paulo)*, 63(1):109-20.
- Simon, A.M., McWhorter, A.R., Chen, H., Jackson, C.L., Ouellette, Y., 2004, Decreased intercellular communication and connexin expression in mouse aortic endothelium during lipopolysaccharide-induced inflammation, *Journal of Vascular Research*, 41(4), 323-333.
- Smith, I., Kumar, P., Molloy, S., Rhodes, A., Newman, P.J., Grounds, R.M., Bennett, E. D., 2001, Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care, *Intensive Care Medicine*, 27(1), 74-83.
- Spray, D.C., Stern, J.H., Harris, A.L., Bennett, M.V., 1982, Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to H and Ca ions, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(2), 441-445.
- Spray, D.C., Ye, Z.C., Ransom, B.R., 2006, Functional connexin “hemichannels”: a critical appraisal, *Glia*, 54.7:758-773.
- Stewart, P., 1983, Modern quantitative acid-base chemistry, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 61:1444-1461.
- Stoessel, A., Himmerkus, N., Bleich, M., Bachmann, S., Theilig, F., 2009, Connexin 37 is localized in renal epithelia and responds to changes in dietary salt intake, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 298(1), F216-F223.
- Suba, E.A., McKenna, T.M., Williams, T.J., 1992, In vivo and in vitro effects of endotoxin on vascular responsiveness to norepinephrine and signal transduction in the rat, *Circulatory Shock*, 36(2), 127-133.
- Suetrong, B., Walley, K.R., 2016, Lactic acidosis in sepsis: it’s not all anaerobic: implications for diagnosis and management, *Chest*, 149(1), 252-26.

- Sung, J., Bochicchio, G.V., Joshi, M., Bochicchio, K., Tracy, K., Scalea, T.M., 2005, Admission hyperglycemia is predictive of outcome in critically ill trauma patients, *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2005;59:80-839.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A. Buell, G., 1996, The cytolitic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7), *Science*, 272, 735-738.
- Syed, A.A., Knowlson, S., Sculthorpe, R., Farthing, D., DeWilde, C., Farthing, C.A., & Fisher, B.J., 2014, Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis, *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 32.
- Szabo, C., Mitchell, J.A., Thiemermann, C., Vane, J.R., 1993, Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock, *British Journal of Pharmacology*, 108(3), 786-792.
- Takenaka, T., Inoue, T., Kanno, Y., Okada, H., Meaney, K.R., Hill, C.E., Suzuki, H., 2008, Expression and role of connexins in the rat renal vasculature, *Kidney International*, 73(4), 415-422.
- Tamion, F., Le Cam-Duchez, V., Menard, J.F., Girault, C., Coquerel, A., Bonmarchand, G., 2004, Erythropoietin and renin as biological markers in critically ill patients, *Critical Care*, R328-R335
- Tani, M., Morimatsu, H., Takatsu, F., Morita, K., 2012, The incidence and prognostic value of hypochloremia in critically ill patients, *The Scientific World Journal*, 2012:474185.
- Taugner, P., Buhle, C.P., Nobiling, R., 1984, Ultrastructural changes associated with renin secretion from juxtaglomerular apparatus of mice, *Cell Tissue Research*, 237:459-472.
- Taugner, R., and Eberhard H., 1989, Morphology of the juxtaglomerular apparatus, *The Juxtaglomerular Apparatus*, Springer, Berlin, Heidelberg, 5-43.
- Taugner, R., Schiller, A., Kaissling, B., Kriz, W., 1978, Gap junctional coupling between the JGA and the glomerular tuft, *Cell and Tissue Research*, 186(2), 279-285.
- Taylor, J.H. and Beilman, G.J., 2005, Hyperglycemia in the intensive care unit: no longer just a marker of illness severity, *Surgical Infections*, 6:233-245.
- Taylor, S.G. and Weston, A.H., 1988, Endothelium-derived hyperpolarizing a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium, *Trends In Pharmacological Sciences*, 9.8:272-274.
- Theis, M., Söhl, G., Eiberger, J., Willecke, K., 2005, Emerging complexities in identity and function of glial connexins, *Trends In Neurosciences*, 28(4), 188-195.
- Timurkaynak, T., 2009, Renin inhibisyonu nedir? Etki mekanizması, *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi* 37. Suppl 7:5-14.


- Toubas, J., Beck, S., Pageaud, A.L., 2011, Alteration of connexin expression is an early signal for chronic kidney disease, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301:F24–32.
- Traub, O., Druge P.M., Willecke K., 1983, Degradation and resynthesis of gap junction protein in plasma membranes of regenerating liver after partial hepatectomy or cholestasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 80:755-759,
- Traub, O., Look, J., Paul, D., Willecke, K., 1987, Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes, *European Journal of Cell Biology*, 143:48-54.
- Tunctan, B., Korkmaz, B., Cuez, T., Kemal Buharalioglu, C., Sahan-Firat, S., Falck, J., Malik, K.U., 2010, Contribution of vasoactive eicosanoids and nitric oxide production to the effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, on endotoxin-induced hypotension in rats, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107(5), 877-882.
- Tunctan, B., Korkmaz, B., Nihal Sari, A., Kacan, M., Unsal, D., Sami Serin, M., Malik, K.U., 2012, A novel treatment strategy for sepsis and septic shock based on the interactions between prostanoids, nitric oxide, and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 11(2), 121-150.
- Tunctan, B., Korkmaz, B., Sari, A.N., Kacan, M., Unsal, D., Serin, M.S., Manthathi, V.L., 2013, Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91phox to the protective effect of 5, 14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock, *Nitric Oxide*, 33, 18-41.
- Tunctan, B., Kucukkavruk, S.P., Temiz-Resitoglu, M., Guden, D.S., Sari, A.N., Sahan-Firat, S., 2018, Bexarotene, a Selective RXR α Agonist, Reverses Hypotension Associated with Inflammation and Tissue Injury in a Rat Model of Septic Shock, *Inflammation*, 41(1), 337-355.
- Tuzcu, M., Gençoğlu, H., ve Sahin, K., 2010, The role of connexins in intercellular communication, *Medical Sciences*, 5.2:18-33.
- Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B. Yeager, M., 1999, Tree-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel, *Science*, 19(283), 1176-1180.
- Van den Berghe, G., Wilmer, A., Hermans, G, Meersseman, W., Wouters, P.J, Milants, I., Van Wijngaerden, E., Bobbaers, H., Bouillon, R., 2006, Intensive insulin therapy in the medical ICU, *New England Journal of Medicine*, 354:449-461.
- Van den Berghe, G., Wouters, P., Weekers, F., Verwaest, C., Bruyninckx, F., Schetz, M., Vlasselaers, D., Ferdinande, P., Lauwers, P., Bouillon, R., 2001, Intensive insulin therapy in the critically ill patients, *New England Journal of Medicine*, 345:1359-1367.
- Van den Berghe, G., Wouters, P.J., Bouillon, R., Weekers, F., Verwaest, C., Schetz, M., Lauwers, P., 2003, Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control, *Critical Care Medicine*, 31(2), 359-366.

- Victor, V.V., Guayerbas, N., Puerto, M., Medina, S., De la Fuente, M., 2000, Ascorbic acid modulates in vitro the function of macrophages from mice with endotoxic shock, *Immunopharmacology*, 46: 89-101.
- Waeschle, R.M., Moerer, O., Hilgers, R., Herrmann, P., Neumann, P., Quintel, M., 2008, The impact of the severity of sepsis on the risk of hypoglycaemia and glycaemic variability, *Critical Care*, 12:R129.
- Wagner, A.J., Holstein-Rathlou, N.H., and Marsh, D.J., 1997, Internephron coupling by conducted vasomotor responses in normotensive and spontaneously hypertensive rats, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 272(3), F372-F379.
- Wagner, C., 2008, Function of connexins in the renal circulation, *Kidney International*, 73.5:547-555.
- Wagner, C., de Wit, C., Kurtz, L., Grünberger, C., Kurtz, A., Schweda, F., 2007, Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion, *Circulation Research*, 100(4), 556-563.
- Wan, L., Langenberg, C., Bellomo, R., May, C.N., 2009, Angiotensin II in experimental hyperdynamic sepsis, *Critical Care*, 13:R190.
- Wang, N., De Vuyst, E., Ponsaerts, R., 2013c, Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury, *Basic Research In Cardiology*, 108:309.
- Wang, W., Falk, S.A., Jittikanont, S., Gengaro, P.E., Edelstein, C.L., Schrier, R.W., 2002, Protective effect of renal denervation on normotensive endotoxemia-induced acute renal failure in mice, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 283(3), F583-F587.
- Wei, C.J., Xu, X., Lo, C.W., 2004, Connexins and cell signaling in development and disease, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20:811-838.
- Whitcomb, B.W., Pradhan, E.K., Pittas, A.G., Roghmann, M.C., Perencevich, E.N., 2005, Impact of admission hyperglycemia on hospital mortality in various intensive care unit populations., *Critical Care Medicine*, 33: 2772-7.
- Wilcox, C.S., 1983, Regulation of renal blood flow by plasma chloride, *The Journal of Clinical Investigation*, 71(3):726-35.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Söhl, G. 2002, Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome, *Biological Chemistry*, 383(5), 725-737.
- Wilson, J.X., 2009, Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium, *Biofactors*, 35:5-13.
- Wilson, J.X., 2013, Evaluation of vitamin C for adjuvant sepsis therapy, *Antioxidants & Redox Signaling*, 19:2129-2140.


- Wong, C.W., Christen, T., Roth, I., 2006, Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion, *Nature Medicine*, 12:950-4.
- Wright, C.S., Van Steensel, M.A., Hodgins, M.B., Martin, P.E., 2009, Connexin mimetic peptides improve cell migration rates of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro, *Wound Repair and Regeneration*, 17:240-9.
- Yamaguchi, N., Jesmin, S., Zaedi, S., Shimojo, N., Maeda, S., Gando, S., and Miyauchi, T., 2006, Time-dependent expression of renal vaso-regulatory molecules in LPS-induced endotoxemia in rat, *Peptides*, 27(9), 2258-2270.
- Yao, J., Morioka, T., Li, B., Oite, T., 2002, Coordination of Mesangial Cell Contraction by Gap Junction-Mediated Intercellular Ca^{2+} Wave, *Journal of The American Society of Nephrology*, 13(8), 2018-2026.
- Yao, J., Oite, T., and Kitamura, M., 2009, Gap junctional intercellular communication in the juxtaglomerular apparatus, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296(5), F939-F946.
- Yao, J., Suwa, M., Li, B., Kawamura, K., Morioka, T., Oite, T., 2003, ATP-dependent mechanism for coordination of intercellular Ca^{2+} signaling and renin secretion in rat juxtaglomerular cells, *Circulation Research*, 93(4), 338-345.
- Yeh, H.I., Lupu, F., Dupont, E., 1997, Upregulation of connexin 43 gap junctions between smooth muscle cells after balloon catheter injury in the rat carotid artery, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17:3174-3184.
- Yip, K.P., Holstein-Rathlou, N.H., Marsh, D.J., 1992, Dynamics of TGF-initiated nephron-nephron interactions in normotensive rats and SHR, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 262(6 Pt 2): F980-F988.
- Yorgancı, K., 2005, Sepsis patofizyolojisi, *Yoğun Bakım Dergisi*, 2:80-1.
- Zhang, J., and Hill, C.E., 2005, Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes, *Kidney International*, 68:1171-1185.
- Zhang, J.T., and J. Nicholson, 1994, The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions, *The Journal of Membrane Biology*, 139.1:15-29.
- Zhou, L., Griffin, J.W., 2003, Demyelinating neuropathies, *Current Opinion In Neurology*, 16:307-313.

EKLER

5.1.1. EK 1. Etik Kurul Karar Metni.



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**



Sayı: 2014/ 43 06 / 03 / 2014


Sayın: Prof. Dr. Cihan Demirci TANSEL
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi

Karar No :2014/ 43

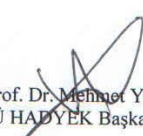
Başvuru :21.02.2014

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Yük. Lisans Öğr. Tuğba KAŞKAVALCI**'ya ait "Lipopolisakkarit Uygulanan Sıçanların Renin – Anjiyotensin Sistemindeki Konneksinlerin Dağılımında Askorbik Asidin Rolü" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

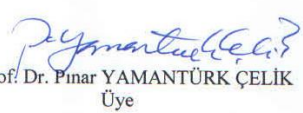
Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	<u>30</u>
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		Haziran 2014/Haziran 2015




Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı



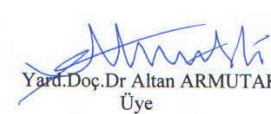
Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İÜ HADYEK Başkan Yardımcısı



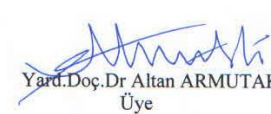
Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye



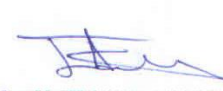
Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye




Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye




Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye



Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye



Dr. Burak OLGUN
Mak. Yük. Müh.
Üye



Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı I.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A
221 nolu Oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tuğba KAŞKAVALCI
Doğum Yeri	Eskişehir
Doğum Tarihi	23.11.1989
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	+90 554 790 50 89
E-Posta Adresi	tugbakaskavalci@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	08.06.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Zooloji Programı

Makale ve Bildiriler	