

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**EMPAGLİFLOZİNİN SIÇANDA LİPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENMİŞ  
SEPSİSTE AKUT BÖBREK HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Sinan Alperen KAYA**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA**

**2022**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**EMPAGLİFLOZİNİN SIÇANDA LİPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENMİŞ  
SEPSİSTE AKUT BÖBREK HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Sinan Alperen KAYA**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Danışman Öğretim Üyesi**

**Prof. Dr. Alper Bektaş İSKİT**

**Doç. Dr. Güray SOYDAN**

**ANKARA**

**2022**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışma sürecimde yetişmemde büyük emekleri olan, bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim danışmanım Doç. Dr. Güray SOYDAN'a

Bilgi ve tecrübelerini uzmanlık eğitim sürecim boyunca benimle paylaşan, akademik gelişimimde katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve danışmanım Prof. Dr. Alper B. İSKİT'e,

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden sıklıkla faydalandığım Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Melih Ö. BABAĞLU, Prof. Dr. M. Yıldırım SARA, ve Doç. Dr. A. Mert ERTUNÇ'a,

Tezimdaki deneylerde bana yardımcı olan ve tez sürecinde yoğun desteklerini aldığım H. Saltuk SONGÜR, Dr. Yaşar Can ALTINIŞIK ve Dr. Esin ÖZÇELEBİ'ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan, öğrenmekten keyif aldığım, tecrübelerini benimle paylaşan ve desteklerini hep yanımda hissettiğim Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve çalışanlarına,

Histopatolojik değerlendirmelerde bana yardımcı olan ve bilgi ve tecrübesini paylaşan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU'na,

Benden desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, yetişip bugünlere gelmemde pek çok emeği olan aileme,

Sevgisiyle ve desteğiyle her daim yanımda olan, hayatın her alanında her zaman yaptığı gibi tez sürecinde de bana güven veren, beni motive eden eşime,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Dr. Sinan Alperen KAYA

## ÖZET

Kontrolsüz inflamasyonla ilerleyen ve ölümcül olabilen sepsiste akut böbrek hasarı ve böbrek yetmezliği sıklıkla gözlenir. Akut böbrek hasarı gelişen sepsis hastalarında mortalite belirgin şekilde daha fazladır.

SGLT-2 proteini böbrekte glomerüllerden filtre edilen glikozun geri emiliminin yaklaşık %90'ından sorumludur. SGLT-2 inhibitörleri böbrek proksimal tübüllerinin kıvrımlı kısmında yaptıkları inhibisyonla glikozun tübüllerden geri emilimini engelleyerek tip 2 diyabet tedavisinde kullanılırlar. Bir SGLT-2 inhibitörü olan empagliflozin tip 2 diyabet ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılır. Kullanımı yaygınlaşan bu ilacın diğer sistemler ve hastalıklar üzerine olan etkileri yaygın olarak incelenmektedir. Çalışmalarda empagliflozinin antiinflamatuvar etkisi olabileceği, böbrek üzerine doğrudan koruyucu etkilerinin olduğu da gösterilmiştir.

Bu çalışmada empagliflozin tedavisinin, LPS ile indüklenen sepsis modelinde, akut böbrek hasarında fizyolojik ve renal fonksiyonlar üzerine olan etkisi değerlendirildi. Empagliflozin idrar glikoz atılımını artırdı, sepsis ile atılımı artan idrar lökosit miktarını azalttı. Empagliflozin tedavisi böbrek, karaciğer ve ileumda sepsis ile azalan damar kan akımlarını geri döndürmedi. İzole perfüze böbrek düzeneğinde sepsis ilişkili akut böbrek hasarında üreter perfüze çıkışı azaldı, empagliflozin tedavisi düzeltici etki göstermedi. Sepsiste renal arter dallarında fenilefrin kasılma yanıtları azaldı, empagliflozin tedavisi düzeltici etki gösterdi. Renal arter ikinci dalında sepsiste anjiyotensin-II kasılma yanıtları arttı, empagliflozin tedavisi bu azalmayı da düzeltti. Renal arter dallarında sepsiste asetilkolin yanıtları azaldı, empagliflozin özellikle renal arter ikinci dalında bu azalmaya düzeltici etki gösterdi. Aynı arterlerde sepsiste SNP yanıtları değişmedi, elektriksel alan stimülasyonu ilişkili kasılma yanıtları azaldı ancak empagliflozin bu azalmayı düzeltici etki yapmadı. Empagliflozin tedavisi sepsiste karaciğer ve ileumda görülen histopatolojik hasarı düzeltici etki yaparken böbrekte tespit edilen histopatolojik hasarı düzeltmedi.

**Anahtar Kelimeler:** Empagliflozin, Sepsis, Böbrek, LPS, Arter, SGLT-2

## ABSTRACT

Sepsis is a fatal disease that progresses with uncontrolled inflammation and acute septic renal injury and kidney failure are frequently observed in sepsis. Mortality is significantly higher in sepsis patients who developed acute kidney injury.

The SGLT-2 protein is common in the convoluted portion of the renal proximal tubules, and approximately 90% of the reabsorption of glucose filtered from the glomeruli is via SGLT-2. SGLT-2 inhibitors inhibit the reabsorption of glucose from the tubules and are used in the treatment of type 2 diabetes. Empagliflozin is an SGLT-2 inhibitor used in the treatment of type 2 diabetes and heart failure, and the effects of this widely used drug on other diseases are a popular research topic. Studies have shown that empagliflozin may have an antiinflammatory effect and have direct protective effects on the kidney.

In this study, the effect of empagliflozin treatment on physiologic and renal functions in LPS-induced acute septic renal injury model was evaluated. Empagliflozin increased urinary glucose excretion and decreased the urinary leukocyte amount whose excretion increased in sepsis. Empagliflozin treatment did not reverse the decreased vascular blood flow in kidney, liver, and ileum associated with sepsis. Ureteral urine outflow was decreased in acute septic renal injury and empagliflozin treatment did not have a corrective effect. In renal artery branches, phenylephrine responses decreased in sepsis, and empagliflozin treatment had a corrective effect. Angiotensin-II contractile responses increased in sepsis in the second branch of the renal artery, and empagliflozin treatment corrected this decrease. In renal artery branches acetylcholine responses were decreased in sepsis and empagliflozin had a corrective effect in the second branch of the renal arter. SNP responses in renal artery branches did not change in sepsis. Contractile responses seen with electrical field stimulation were decreased in renal artery branches in sepsis, but empagliflozin did not have a corrective effect. Empagliflozin treatment had a corrective effect on the histopathological damage seen in the liver and ileum in sepsis, but not in the kidney.

**Keywords:** Empagliflozin, Sepsis, Kidney, LPS, Artery, SGLT-2

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
ŞEKİL DİZİNİ .....	ix
TABLO DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Böbrek Anatomisi ve Fizyolojisi .....	2
2.2 Sepsis .....	3
2.2.1. Sepsis Tanımı .....	3
2.2.2. Sepsis ilişkili Akut Böbrek Hasarı .....	3
2.2.3. Sepsis Patofizyolojisi .....	4
2.2.4 Sepsiste Deneysel Hayvan Modelleri .....	5
2.3. Sodyum bağımlı glikoz transport proteinleri (SGLT'ler) .....	6
2.4. Sodyum bağımlı glikoz transport protein-2 (SGLT-2) inhibitörleri .....	7
2.5. Hipotez.....	10
2.6. Amaç.....	10
3. YÖNTEMLER .....	11
3.1. Deney Hayvanları.....	11
3.2. Etik Kurul İzni .....	11
3.3. Deney Protokolü ve İlaç Uygulamaları .....	11
3.4. Fonksiyonel Değerlendirme.....	13
3.4.1. <i>In vivo</i> Değerlendirme.....	13

3.4.2. <i>Ex vivo</i> Değerlendirme .....	14
3.4.2.1. İzole Perfüze Böbrek Düzenegi.....	14
3.4.2.2. Miyograf .....	16
3.4.2.3. Organ Banyosu .....	18
3.5. İdrar Örneğinin Alımı, Histopatoloji için Örneklerin Toplanması .....	18
3.6. Histopatolojik Değerlendirme .....	19
3.7. İstatistiksel Analiz .....	22
4. BULGULAR .....	23
4.1. Genel Değerlendirmeler .....	23
4.1.1. Kan Glikozu Ölçümleri.....	23
4.1.2. İdrarda Glikoz Ölçümleri .....	25
4.1.3. İdrarda Lökosit Ölçümleri .....	26
4.1.4. Vücut Ağırlık Kaybı Ölçümleri .....	27
4.2. Fonksiyonel Değerlendirmeler .....	28
4.2.1. In Vivo Ölçümler.....	28
4.2.1.1. Renal Arter Kan Akımı Ölçümü Sonuçları.....	28
4.2.1.2. Superior Mezenter Arter Kan Akımı Ölçümü Sonuçları.....	30
4.2.1.3. Portal Ven Kan Akımı Ölçümü Sonuçları.....	32
4.2.2. Ex Vivo Ölçümler .....	34
4.2.2.1. İzole Perfüze Böbrek Düzenegi Sonuçları .....	34
4.2.2.1.1. Böbrek Ağırlığının Hayvan Ağırlığına Oranı.....	34
4.2.2.1.2. Bazal Perfüzyon Basıncı.....	35
4.2.2.1.3. Fenilefrin .....	36
4.2.2.1.4. Norepinefrin.....	37
4.2.2.1.5. Asetilkolin.....	38
4.2.2.1.6. Anjiyotensin-II.....	39
4.2.2.1.7. SNP.....	40
4.2.2.1.8. Üreter Perfüze Çıkışı.....	41



4.2.2.2. Miyograf Sonuçları.....	42
4.2.2.2.1. Renal Arterin İkinci Dal Sonuçları.....	42
4.2.2.2.1.1. 80 mM KCl Kasılması.....	42
4.1.2.2.1.2. Fenilefrin Kasılması .....	43
4.2.2.2.1.3. Asetilkolin Gevşemesi.....	45
4.2.2.2.1.4. Anjiyotensin-II Kasılması .....	47
4.2.2.2.1.5. SNP Gevşemesi .....	49
4.2.2.2.1.6. Elektriksel Alan Stimülasyonu.....	51
4.2.2.2.2 Böbrek Segmental Arter Sonuçları.....	52
4.2.2.2.2.1 80 mM KCl Kasılması.....	52
4.2.2.2.2.2. Fenilefrin Kasılması .....	53
4.2.2.2.2.3. Asetilkolin Gevşemesi.....	55
4.2.2.2.2.4. Anjiyotensin-II Kasılması .....	57
4.2.2.2.2.5. SNP Gevşemesi .....	59
4.2.2.2.2.6. Elektriksel Alan Stimülasyonu.....	60
4.2.2.3. Aort Sonuçları.....	61
4.2.2.3.1 80mM KCl Kasılması.....	61
4.2.2.3.2. Fenilefrin Kasılması .....	62
4.2.2.3.3. Asetilkolin Gevşemesi .....	63
4.2.2.3.4. Anjiyotensin-II Kasılması .....	64
4.2.2.3.5. SNP Gevşemesi .....	65
4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	66
4.3.1. Böbrek Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	66
4.3.2. Karaciğer Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	68
4.3.3. İleum Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	70
5. TARTIŞMA.....	72
5.1. Empagliflozin idrar glikoz atılımını artırdı, kan glikozunu değıştirmede.....	72
Empagliflozin tedavisi LPS ile atılımı artan idrar lökosit miktarını azalttı.	
5.2. Empagliflozin tedavisi böbrek, karaciğer ve ileumda LPS ile azalan .....	73
kan akımını geri döndürmedi.	

5.3. İzole perfüze böbrek düzeneğinde sepsis ilişkili akut böbrek hasarında .....	76
üreter perfüze çıkışı azaldı, empagliflozin tedavisinin olumlu etkileri gözlemlendi.	
5.4. Renal arter dallarında ve aortta sepsiste fenilefrin kasılma yanıtları .....	78
azaldı, empagliflozin tedavisi renal arter dallarında bu azalmayı düzeltti. İzole perfüze böbrek düzeneğinde kasılma yanıtları değişmedi.	
5.5. Sepsiste aortta anjiyotensin-II kasılma yanıtları azalırken renal arter .....	79
ikinci dalında anjiyotensin-II kasılma yanıtları arttı, empagliflozin tedavisi renal arter ikinci dalında bu artışı düzeltti.	
5.6. Renal arter dallarında ve izole perfüze böbrekte sepsiste asetilkolin .....	80
gevşeme yanıtları azalırken aortta arttı, empagliflozin bu değişikliklere düzeltici etki gösterdi.	
5.7. Renal arter dallarında sepsiste SNP gevşeme yanıtları değişmezken .....	82
izole perfüze böbrekte ve aortta azaldı.	
5.8. Renal arter dallarında sepsiste elektriksel alan stimülasyonu ilişkili .....	82
kasılma yanıtları azaldı, empagliflozin bu azalmayı düzeltici etki yapmadı.	
5.9. Empagliflozin tedavisi sepsiste karaciğer ve ileumda görülen .....	84
histopatolojik hasarı düzeltici etki yaparken böbrekte görülen histopatolojik hasara karşı düzeltici etki göstermedi.	
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	86
7. KAYNAKLAR.....	87

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>AMPK</b>	AMP kinaz
<b>AT-II</b>	Anjiyotensin-II
<b>ACh</b>	Asetilkolin
<b>CLP</b>	Çekal ligasyon ve delme
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>EAS</b>	Elektriksel Alan Stimülasyonu
<b>Emax</b>	Maksimum Yanıt
<b>gr</b>	Gram
<b>GRK</b>	G protein reseptör kinaz
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>i.p.</b>	İntraperitoneal
<b>i.v.</b>	İntravenöz
<b>KCl</b>	Potasyum Klorür
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>NE</b>	Norepinefrin
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	Nitrik Oksit Sentaz
<b>OAB</b>	Ortalama Arter Basıncı
<b>PE</b>	Fenilefrin
<b>sGC</b>	Soluble guanilat siklaz
<b>SGLT</b>	Sodium-glucose linked transporter Sodyum bağımlı glikoz taşıyıcı protein (sodyum glikoz taşıyıcı protein)
<b>SNP</b>	Sodyum Nitroprusiyat
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboksan A <sub>2</sub>

## ŞEKİL DİZİNİ

**Şekil 3.1** Deney protokolü

**Şekil 3.2.** Kan akımı ölçümünde kullanılan cihaz ve prob

**Şekil 3.3.** Mikroskop altında renal arter ve dallarının görünümü

**Şekil 3.4.** Miyograf

**Şekil 4.1.** Kuyruk veni kan glikozu ölçüm sonuçları

**Şekil 4.2.** İdrarda glikoz ölçümleri

**Şekil 4.3.** İdrarda lökosit ölçümleri

**Şekil 4.4.** Ağırlık kaybının vücut ağırlığına oranı ölçümleri

**Şekil 4.5.** Renal arter kan akım hızı ölçümleri

**Şekil 4.6.** Renal arter vücut ağırlığına oranlı kan akım hızı ölçümleri

**Şekil 4.7.** Superior mezenter arter kan akım hızı ölçümleri

**Şekil 4.8.** Superior mezenter arter vücut ağırlığına oranlı kan akım hızı ölçümleri

**Şekil 4.9.** Portal ven kan akım hızı ölçümleri

**Şekil 4.10.** Portal ven vücut ağırlığına oranlı kan akım hızı ölçümleri

**Şekil 4.11.** İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek ağırlığı / hayvan vücut ağırlığı ölçümleri

**Şekil 4.12.** İzole perfüze böbrek düzeneği bazal basınç düzeyleri

**Şekil 4.13.** İzole perfüze böbrek düzeneği fenilefrin yanıtları

**Şekil 4.14.** İzole perfüze böbrek düzeneği norepinefrin yanıtları

**Şekil 4.15.** İzole perfüze böbrek düzeneği asetilkolin yanıtları

**Şekil 4.16.** İzole perfüze böbrek düzeneği anjiyotensin-II yanıtları

**Şekil 4.17.** İzole perfüze böbrek düzeneği SNP yanıtları

**Şekil 4.18.** İzole perfüze böbrek düzeneği üreter perfüze çıkışı ölçümleri

**Şekil 4.19.** Renal arterin ikinci dalında 80mM KCl yanıtları

**Şekil 4.20.** Renal arterin ikinci dalında fenilefrin yanıtları

**Şekil 4.21.** Renal arterin ikinci dalında fenilefrin maksimum yanıtları (Emax)

**Şekil 4.22.** Renal arterin ikinci dalında asetilkolin yanıtları

**Şekil 4.23.** Renal arterin ikinci dalında asetilkolin Emax yanıtları

**Şekil 4.24.** Renal arterin ikinci dalında anjiyotensin-II yanıtları

**Şekil 4.25.** Renal arterin ikinci dalında anjiyotensin-II Emax yanıtları

**Şekil 4.26.** Renal arterin ikinci dalında SNP yanıtları

**Şekil 4.27.** Renal arterin ikinci dalında SNP Emax yanıtları

**Şekil 4.28.** Renal arterin ikinci dalının elektriksel alan stimülasyonu yanıtları

**Şekil 4.29.** Segmental arter 80mM KCl yanıtları

**Şekil 4.30.** Segmental arter fenilefrin yanıtları

**Şekil 4.31.** Segmental arter fenilefrin Emax yanıtları

**Şekil 4.32.** Segmental arter asetilkolin yanıtları

**Şekil 4.33.** Segmental arter asetilkolin Emax yanıtları

**Şekil 4.34.** Segmental arter anjiyotensin-II yanıtları

**Şekil 4.35.** Segmental arter anjiyotensin-II Emax yanıtları

**Şekil 4.36.** Segmental arter SNP yanıtları

**Şekil 4.37.** Segmental arter elektriksel alan stimülasyon yanıtları

**Şekil 4.38.** Aort 80mM KCl yanıtları

**Şekil 4.39.** Aort fenilefrin yanıtları

**Şekil 4.40.** Aort asetilkolin yanıtları

**Şekil 4.41.** Aort anjiyotensin-II yanıtları

**Şekil 4.42.** Aort SNP yanıtları

**Şekil 4.43.** Sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde oluşan böbrek hasarına empagliflozinin etkisi

**Şekil 4.44.** Sıçanda sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde böbrekte oluşan hasarı ışık mikroskopunda gösteren fotoğraflar

**Şekil 4.45.** Sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde oluşan karaciğer hasarına empagliflozinin etkisi

**Şekil 4.46.** Sıçanda sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde karaciğerde oluşan hasarı ışık mikroskopunda gösteren mikrofotoğraflar

**Şekil 4.47.** Sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde oluşan ileum hasarına empagliflozinin etkisi

**Şekil 4.48.** Sıçanda sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde ileumda oluşan hasarı ışık mikroskopunda gösteren mikrofotograflar

**TABLO DİZİNİ**

**Tablo 3.1.** Gruplar ve deney protokolünde gruplara verilen ilaçlar

**Tablo 3.2.** Böbrek histopatolojik değerlendirme kriterleri

**Tablo 3.3.** Karaciğer histopatolojik değerlendirme kriterleri

**Tablo 4.1.** İdrar Glikoz ve Lökosit Ölçümleri

## 1. GİRİŞ

Sepsis kontrolsüz inflamasyon sonucunda oluşan, farklı organ ve sistemlerde fonksiyon kaybına sebep olabilen, tedaviye rağmen ölümlü sonuçlanabilen bir hastalık olup hastanelerde önde gelen ölüm sebepleri arasında yer almaktadır.

Sepsiste hasar gören en önemli organlardan biri böbrektir (1). Akut böbrek hasarı ve ilişkili yetmezlik, sepsiste görülebilen çoklu organ yetmezliği tablosuna sıklıkla dahil olur. Akut böbrek hasarı oluşan sepsisli hastalarda mortalite çok daha yüksektir, böbrek tutulumu ve buna bağlı yetmezlik gelişen sepsisli hastalarda ölüm oranları %70 gibi çok yüksek yüzdelerle çıkabilmektedir (2, 3).

Sepsiste böbrek hasarı prognozu doğrudan etkiler (4). Böbreklere kan renal arterler vasıtasıyla gelir. Renal arter böbreğe girdikten sonra ilk olarak segmental arterlere ayrılmakta, segmental arterlerden de interlobar arter ve devamındaki dallar şeklinde devam etmektedir. Böbrekte renal arterden başlayan ve damarlar boyunca ilerleyen sempatik innervasyon renal vasküler tonüs, su ve elektrolit emilimi üzerine etkilidir. Sepsiste renal sempatik aktivasyonda artış görülür.

Sodium-glucose linked transporter-2 (SGLT-2; Sodyum bağımlı glikoz taşıyıcı protein) böbrek proksimal tübüllerinin kıvrımlı kısmında yaygındır. Böbrekte glomerüllerden filtre edilen glikozun geri emiliminin yaklaşık %90'ı SGLT-2 üzerinden olmaktadır. SGLT-2 inhibitörlerinin böbrekteki SGLT-2 proteinlerini inhibe ederek veya böbrekte doğrudan koruyucu etki göstererek farklı patolojilerde koruyucu, düzeltici olabileceği düşünülmektedir. SGLT-2 inhibitörlerinin kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte SGLT-2 üzerinden olmayan başka etkilerinin de olabileceğini düşündüren bulgular elde edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda SGLT-2 inhibitörlerinin vasküler tonus üzerine doğrudan etkilerinin olduğu da gösterilmiştir.

Yapılacak olan bu çalışmada empagliflozin tedavisinin LPS ile indüklenen sepsis modelinde akut böbrek hasarında renal ve fizyolojik fonksiyonlara etkisinin fonksiyonel ve histopatolojik olarak değerlendirilerek gösterilmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Böbrek Anatomisi ve Fizyolojisi

Böbrekler, yapısal veya fonksiyonel olarak yoklukları ölümlle sonuçlanan organlardır. Vücutta fizyolojik süreçlerin devamlılığının sağlanmasında yaşamsal bir rol üstlenmektedirler. Boyutça küçük olmalarına karşın kardiyak debinin %25'ini alırlar.

Böbreklere kan renal arterler vasıtasıyla gelir, gelen kanın %85'i renal kortekste dolaşırken %15'i medullaya geçer. Medullanın iç kısmına ise gelen kanın sadece %1'i ulaşmaktadır. Renal arterler böbreğe girdikten sonra ilk olarak segmental arterlere ayrılmakta, segmental arterlerden de interlobar arterlere ayrılmaktadır. İnterlobar arterler arkuat arterlere dallanmakta onlardan da interlobular arterler ayrılmaktadır. İnterlobuler arterlerin dallanmasıyla ise önce afferent arteriyoller, onlardan da glomerüler kapillerler oluşmaktadır. Glomerüllerden çıkan damarlar ise efferent arteriyoller olarak adlandırılmakta, onlardan da peritübüler (intersitisyel) arteriyoller dallanmaktadır. Efferent arteriyoller aynı zamanda vasa rectalar aracılığıyla böbrek medullasını da kanlandırmaktadır (5).

Sempatik sinir sisteminin renal sempatik innervasyon aracılığı ile böbrek fonksiyonlarını kontrol ettiği uzun yıllardır bilinen bir konudur. Yapılan pek çok çalışmayla sempatik sinir sisteminin renal vasküler tonüs, renin sekresyonu, su ve elektrolitlerin emilimi gibi konularda düzenleyici etkisi ortaya konmuştur (6-8). Böbrekte renal arterden başlayarak bütün damar ağı boyunca yaygın bir sempatik innervasyon mevcuttur (9, 10). Sempatik uyarıma bağlı olarak afferent ve efferent arteriollerdeki innervasyon glomerüler filtrasyon hızını değiştirebilir (6). Renal sempatik innervasyonun uyarımı ile sempatik katekolaminerjik sinir uçlarından norepinefrin saliverilir. Norepinefrin saliverilmesinde modülasyon presinaptik ve postsinaptik reseptörler ile olur (11, 12).

## **2.2. Sepsis**

### **2.2.1. Sepsis Tanımı**

Sepsis farklı organ ve sistemlerde, kontrolsüz inflamasyon nedeniyle fonksiyon kaybına sebep olabilir. Yoğun bakım tedavisi gerektirebilir ve tedaviye rağmen ölümlerle sonuçlanma olasılığı vardır ve hatta hastanelerde önde gelen ölüm sebepleri arasında yer almaktadır (13). Sepsis tanısı için yaygın olarak kullanılan SOFA (sepsis related organ failure assesment) skora sisteminde solunum sistemi, sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, koagülasyon sistemi, karaciğer ve böbrek değerlendirilmektedir (13, 14).

### **2.2.2. Sepsis İlişkili Akut Böbrek Hasarı**

Sepsis gibi tüm sistemleri etkileyebilen bir hastalıkta pek çok organ hasar görmekte olup bunların en önemlilerinden biri böbrektir. Akut böbrek hasarı ve ilişkili yetmezlik, sepsiste görülebilen çoklu organ yetmezliği tablosuna sıklıkla dahil olur. Yapılan bir araştırmada yoğun bakım hastalarında akut böbrek hasarının görülme sıklığı %6 oranında bulunmuş olup akut böbrek hasarı gelişen hastalarda en sık görülen hastalığın sepsis olduğu (%50) tespit edilmiştir (15). Akut böbrek hasarı gelişen sepsisli hastalarda mortalite daha fazladır. Böbrek tutulumu ve buna bağlı yetmezlik gelişen sepsisli hastalarda ölüm oranları %70 gibi çok yüksek yüzdelerle çıkmaktadır (2). Glomerüler filtrasyon hızında ani azalma, serum kreatininde yükselme tanı koymada önemlidir. Sepsis ilişkili akut böbrek hasarının patofizyolojisinde pek çok farklı faktör önemli olup bunlara endotel disfonksiyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, enerji metabolizmasında bozulma, böbrek hücrelerinin dolaşımdaki sitokin ve kemokinlere maruziyeti örnek verilebilir (renal makro ve mikrodolaşımda bozulma, inflamatuvar belirteçlerde ve oksidatif strese artış, koagülasyon kaskadının aktifleşmesi vb.). Sepsiste mortalitenin en önemli sebeplerinden biri olmasına rağmen akut böbrek hasarı tedavisinde ilerlemeler istenilen düzeyde değildir ve farklı farmakolojik ajanlarla yapılacak yeni tedavi arayışı devam etmektedir.

### 2.2.3. Sepsis Patofizyolojisi

Yoğun bir şekilde araştırılmasına rağmen sepsis patofizyolojisi henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. Uygulanan tüm tedavilere rağmen iyileşme oranları da hala istenilen seviyeye getirilememiştir. Pek çok farklı etmen patogenezde rol oynamaktadır. Sepsiste sempatik aktivasyonda artış olmaktadır (16), bu durum sepsis ilişkili akut böbrek hasarı patofizyolojisinde önemli rol oynar. Sepsiste norepinefrin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan tirozin hidroksilaz enzimi indüklenir (17). Norepinefrinin sentezi dışında saliverilmesinde rol oynayan etkenler de sepsis ile tetiklenir, sentezlenen norepinefrinin nörondan saliverilmesinde rol oynayan sintaksin-1A sepsiste artarken saliverilen norepinefrinin geri alımında rol oynayan norepinefrin taşıyıcısı (NET) azalır (18). Sepsiste bu anlatılan mekanizmaların sonucunda dolaşıma özellikle barsaktaki myenterik plexus nöronlarından masif miktarda norepinefrin saliverilir. Saliverilen norepinefrin TNF-alfa, İnterlökin-1 Beta (IL-1  $\beta$ ), IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin dolaşımdaki miktarını artırır (19).

Sepsiste hasarın gelişmesinde en önemli faktörlerden biri mikrovasküler regülasyonda bozulma ve endotel disfonksiyonudur. Bu bozulma sepsisten etkilenen bütün organlarda oluşmaktadır (20). Sistemik dolaşımın yanı sıra mikrodolaşımda da bozulma meydana gelmektedir (21). Mikrodolaşımda meydana gelen bozulmalar sonucunda renal perfüzyonda azalma ve endotel fonksiyonunun bozulması sepsis ilişkili akut böbrek hasarının başlıca mekanizmalarındandır (22). Daha önce yapılan çalışmalarda vazokonstriktör ve vazodilatör cevaplarının sepsiste değişiyor olması ve bu değişikliklerin sepsis ilişkili akut böbrek hasarında daha farklı gerçekleşiyor olması, vazokonstriktör molekül reseptörlerin ekspresyonlarındaki değişim akut böbrek hasarında vasküler disfonksiyonun önemini ortaya koymaktadır (23-25).

Sepsis patogenezinde kontrolsüz inflamasyon dışında önde gelen etkenlerden biri de apoptozdur. Yapılan araştırmalarda sepsiste immünolojik yanıtların bozulduğu, sepsis ilerledikçe immünoparaliz olarak da adlandırılan vücudun patojenlere karşı savunma yeteneğinin ortadan kaybolduğu durum gözlenmiştir. İmmünoparalizin sebeplerinden biri lenfosit ve dendritik hücreler gibi immün

sistemin önemli hücrelerinin sepsis ile indüklenen apoptoz sebebiyle ölmesidir (26). Diğer hücreler gibi endotel hücreleri de sepsiste apoptoz ile ölebilir (27). Bu durum damar fonksiyonlarını etkileyebilir. Sepsis ilişkili akut böbrek hasarında apoptozun rolü de pek çok çalışmada incelenmiştir (28, 29). Sepsisli hastaların renal biyopsilerinde renal tübüler hücrelerde apoptoz gösterilmiştir. Kaspazlar apoptotik hücre ölümü patogenezinde önemli rol oynar. Sepsis ilişkili akut böbrek hasarında da kaspazların rolü incelenmiş kaspaz-3 aktivitesinin renal disfonksiyon ile korele olduğu gösterilmiştir (30). Aynı çalışmada kaspaz inhibisyonunun renal fonksiyonlardaki bozulmayı kısmen azalttığı bulunmuştur. Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada kaspaz inhibisyonunun apoptozu ve tübüler nekrozu azalttığı, renal fonksiyonlarda bozulmayı düzelttiği gösterilmiştir (31).

Piroptoz da sepsis patogenezinde önemli etkenlerden biridir. Piroptoz da apoptozla benzetmekle birlikte inflamatuvar süreçlerin programlanmış hücre ölümü tipi olup daha çok kaspaz-1 aracılı ilerler (32). Sepsis ilişkili akut böbrek hasarında patogenezinde piroptozun etkisi de araştırılmıştır. Zebra balıkları ile yapılan bir çalışmada "Casp-2" olarak adlandırılan zebra balığı kaspazının aktive olmasıyla piroptoz sürecinde belirgin bir rol oynadığı gösterilmiştir (33). Yapılan başka bir çalışmada da sepsis ilişkili akut böbrek hasarında kaspaz-11'in renal tübüler hücrelerde piroptozda rol oynadığı gösterilmiştir (34).

#### **2.2.4. Sepsiste Deneysel Hayvan Modelleri**

Deneysel hayvan çalışmalarında sepsis modeli oluşturmak için tercih edilen yöntemlerin başlıcaları LPS verme, intravasküler canlı bakteri infüzyonu, peritonit oluşturma olarak ifade edilebilir (35-37). Peritonit oluşturmak için yaygın kullanılan yöntemlerden biri Wichterman tarafından geliştirilen çekal ligasyon ve delme (CLP, cecal ligation and puncture) yöntemidir (38). Bu yöntemin dışında fekal materyal veya saf bakteri kültürünün barsağa damlatılması ile de peritonit oluşturulabilir (39). LPS verme deney hayvanlarında sepsis modeli oluşturmada sıkça tercih edilen bir yöntem olup endotoksin veya diğer adıyla lipopolisakkarit (LPS)'in bolus veya infüzyonla verilmesi şeklinde olabilir. Veriliş yolu olarak intraperitoneal (i.p.) veya intravenöz

(i.v.) yol seçilebilir. LPS gram negatif bakteri hücre duvarı temel bileşeni olup içeriğindeki lipid-A sepsiste inflamasyonu tetikleyerek süreçte önemli rol oynar (39, 40).

Sepsis modeli olarak LPS kullanılmasının CLP ile yapılan sepsis modeline kıyasla çok daha yüksek miktarda inflamatuvar sitokin salıverilmesine sebep olduğu gösterilmiştir (41). Bu durum vazokonstriksiyonu artırıp kalp debisini azaltarak hipodinamik fazın ortaya çıkmasına yol açar (42). Ölümcül olmayan, düşük dozlarda bolus LPS verilmesi çoğunlukla hiperdinamik fazı tetiklerken yüksek doz LPS bolus enjeksiyonu ile yapılan sepsis modellerinde sepsisin hipodinamik fazı daha sık ortaya çıkmaktadır (43). Hiperdinamik fazda ölçümlerde renal kan akımında artma daha sık görülürken hipodinamik faz ölçümlerinde renal kan akımında azalma baskındır (44).

### **2.3. Sodyum bağımlı glikoz transport proteinleri (SGLT'ler)**

Sodyum bağımlı glikoz transport proteinleri (SGLT'ler) esas olarak barsakta ve böbrekte bulunmaktadır. Bu taşıyıcı proteinler sodyum ve glikozu birlikte lümeninden hücre içine alma yönünde çalışırlar. Na/K ATPaz pompası ile hücre içi ve dışı arasında sodyum konsantrasyon farkı oluşturulmakta bu sayede hücre içine girme eğiliminde olan sodyum ile beraber glikoz da apikal membrandan hücre içine alınmaktadır (simport). Bu olay sekonder aktif transport olarak ifade edilir. Bu proteinlerin başlıca iki alt tipi bulunmakta olup bunlar SGLT-1 ve SGLT-2 olarak isimlendirilirler. SGLT-1 bazen SLC5A1 (solute carrier family 5 member-1) olarak da adlandırılır, SGLT-2 ise SLC5A2 olarak da adlandırılabilir.

SGLT-1 esas olarak ince barsak mukozasında ve böbrek proksimal tübülünün düz kısmında (proksimal straight tubule) yani S3 segmentinde de bulunur. Ayrıca trakea, kalp, beyin, testis ve prostatta da dağılım gösterir. SGLT-2 ise belirgin olarak böbrek proksimal tübüllerinin kıvrımlı kısmında (proksimal convoluted tubule) yani S1 ve S2 segmentlerinde yaygındır. Ek olarak beyin, karaciğer, tiroid bezi ve kalpte de bulunabilir. Böbrekte glomerüllerden filtre edilen glikozun sağlıklı kişide tamamı tübüllerden geri emilir. Bu geri emilimin yaklaşık %90'ı SGLT-2 üzerinden olmaktadır. Kalan yaklaşık %10'luk kısmın çok büyük bir bölümü de SGLT-1 ile geri emilir.

#### 2.4. Sodyum bağımlı glikoz transport protein-2 (SGLT-2) inhibitörleri

Gliflozinler böbrekteki SGLT-2 proteinlerini inhibe ederler. Bu sayede glikozun geri Emilimini engelleyerek kan şekerini düşürürler, geri Emilimi engellenen glikoz idrar yoluyla vücuttan atılır. Bu etkileri sebebiyle gliflozinler Tip 2 Diabetes Mellitus tedavisinde kullanılmaktadır. Etkileri insülin salıverilmesinden bağımsız olup etki için fonksiyonel pankreas beta hücrelerine ihtiyaç yoktur. Gliflozinler SGLT-1 proteinlerine etki etmezler. SGLT proteinlerini non-selektif olarak inhibe eden ajanlarla yapılan çalışmalar barsakta SGLT-1 inhibisyonuna bağlı görülen şiddetli diyare, dehidratasyon gibi yan etkiler yüzünden ilaca dönüşmemiştir.

SGLT-2 inhibitörlerinin böbrekte doğrudan koruyucu etkilerinin de olabileceği düşünülmektedir. Tübüler hipertrofiyi ve diyabete bağlı görülen hiperfiltrasyonu azaltıcı doğrudan etkinin olabileceğini düşündüren yayınlar mevcuttur (45). SGLT-2 inhibitörlerinin böbrek dışında diğer dokularda da etkileri araştırılmaktadır. Bu gruptan bir ilaç olan empagliflozin de böbrekte sodyum glikoz kotransporter-2 üzerinde inhibisyon yaparak etki göstermektedir.

SGLT-2 inhibitörlerinin kullanımının giderek artmasıyla birlikte ortaya çıkan çalışmalarda bu ilaçların böbrek hasarının ilerlemesinde yavaşlama, majör kardiyovasküler komplikasyonlarda azalma, kalp yetmezliğine bağlı hastaneye yatışta azalma gibi önemli faydaları olduğuna dair veriler elde edilmiştir (46-48). Bahsedilen bu etkilerin sadece glisemik kontrol ile açıklanamayabileceği de öne sürülmüştür. Bu durum SGLT-2 inhibitörlerinin "off-target" yani SGLT-2 üzerinden olmayan başka etkilerinin de olabileceğini düşündürmüştür, bu durum kullanımı giderek yaygınlaşan bu ilaçlar için güncel bir araştırma konusu olmuştur.

Yapılan çalışmalarda SGLT-2 inhibitörlerinin SGLT-2 reseptörleri tespit edilmemiş olmasına rağmen kalpte Na-H antiporter pompası üzerinde inhibisyon yönünde etkisinin olabileceği öne sürülmüştür (49). Bu pompa hücre içine sodyumu alırken hidrojeni dışarı atarak hücre içi pH ve sodyum dengesinde önemli rol oynamaktadır. Pompanın SGLT-2 inhibitörleri ile inhibe edilmesiyle hücre içi pH'nin normale dönüşü yavaşlamakta olup bu durumun iskemik önkoşullama benzeri bir

etkiye yol açarak kalp ve böbrekte koruyucu etkili olabileceği iddia edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada SGLT-2 inhibitörlerinin sempatik sinir sistemi ile etkileştiği, nörojenik hipertansif farede böbrekte tirozin hidroksilaz ve norepinefrin düzeylerini azalttığı ve bunun sonucunda kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir (50).

Empagliflozin, SGLT-2 inhibitörü ilaç grubunun üyesi olup 2014 yılında tip 2 diabetes mellitus tedavisinde onay alarak piyasaya çıkmıştır. Kimyasal olarak C-glikozid yapısındadır (51). Empagliflozin idrarla glikoz atılımını artırır, diüretik ve natriüretik etki de gösterir (52). Empagliflozinin insanlarda SGLT-2'ye SGLT-1'e oranla 2500 kattan daha fazla seçici olduğu gösterilmiştir (53).

Empagliflozinin SGLT-2 inhibitörlerinin yukarıda bahsedilen bilinen etkileri dışında farklı hastalık modellerinde farklı etkileri de araştırılmaktadır. Diyabet modellerinde kalpte, karaciğerde ve böbrekte inflamasyonu azaltıcı etkisi pek çok çalışmada gösterilmiş olup bu etki diyabet olmaksızın kalp yetmezliği modelinde de gösterilmiştir (54-56). Bu durum empagliflozinin diyabetten bağımsız olarak da etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Empagliflozin ile farelerde yapılan bir çalışmada sepsis ilişkili akut böbrek hasarı modelinde ilacın sistemik ve renal inflamasyonu baskıladığı, sağ kalımı artırdığı iddia edilmiş, ancak bu çalışmada fonksiyonel açıdan bir değerlendirme yapılmamıştır (57).

Empagliflozinin kalpte miyokard enfarktüsü üzerine koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada STAT-3 proteini üzerinden etki gösterdiği iddia edilmiştir (58). Empagliflozin STAT-3'ü fosforile ederek aktive ettiği, STAT-3 aktivasyonu ile MPTP (mitochondrial permeability transition pore) üzerinden reaktif oksijen türevlerinin üretimini azaltarak koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir. STAT-3'ün aktive olunca nükleusa geçerek transkripsiyon faktörü olarak davrandığı, iNOS ekspresyonunu ve kardiyomyosit apoptozunu azalttığı tespit edilmiştir (59). STAT-3'ün ayrıca Nf-KB'nın p65 alt ünitesi üzerinden Nf-KB düzeyini değiştirmeden IL-6 ve iNOS ekspresyonunu azalttığı da belirlenmiştir (58).

Empagliflozin gibi bir SGLT-2 inhibitörü olan kanagliflozin ile yapılan birbirinin devamı niteliğindeki iki çalışmanın sonucunda sepsiste kötü prognozla ilişkili olan

sepsis kapiller sızıntı sendromuna karşı ilacın endotel kaynaklı  $\alpha$ 1AMP-activated protein kinaz ( $\alpha$ 1AMPK) aktivasyonu ile koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir (60). Yine kanagliflozin ile sıçanlarla yapılan bir çalışmada da iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde gelişen endotel disfonksiyonunu ilacın hafiflettiği gösterilmiştir (61).

SGLT-2 inhibitörleri damar fonksiyonları üzerine endotel veya damar düz kas hücreleri üzerinden çeşitli mekanizmalar ile etki gösterir. Yapılan bir çalışmada kanagliflozinin insan umbilikal ven ve aort endotel hücrelerinde AMPK (5' adenosine monophosphate- activated protein kinase) aktivasyonu yaptığı gösterilmiş olup aynı çalışmada yine kanagliflozinin insan aort vasküler düz kas hücre kültüründe de AMPK aktivasyonu yaptığı gözlenmiştir (62). Yine aynı çalışmada empagliflozin ve dapagliflozinin hücre viabilitesi üzerine koruyucu etkili olduğu bulunmuştur. Hipoksi-reoksijenasyon hasarında empagliflozinin etkileri incelendiğinde hücre viabilitesini artırdığı ve ATP düzeylerini koruduğu ortaya konmuştur (58). Hiperglisemik fare aortunda yapılan bir çalışmada da empagliflozinin mitokondriyal disfonksiyonu engellediği gösterilmiştir (63).

SGLT-2 inhibitörlerinin vasküler tonus üzerine doğrudan etkileri de güncel bir araştırma konusudur. Yapılan bir çalışmada streptozotosin verilerek diyabet modeli oluşturulan farelerde non-spesifik SGLT inhibitörü florizin ile dapagliflozinin pulmoner arter ile koroner artere doğrudan etkileri araştırılmış, pulmoner arterde gevşeme yanıtına sebep oldukları gösterilmiştir. Koroner arterde ise etkileri tespit edilememiş olup bu durum SGLT-2 inhibitörlerinin etkilerinin damar yatağı spesifik olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmanın devamında pulmoner arterde SNP aracılı gevşeme yanıtlarını ise azalttıkları da gözlenmiştir (64). Yapılan başka bir çalışmada kanagliflozinin insan viseral yağ doku arterleri üzerine etkisi incelenmiş, bu arterlerde doğrudan banyoya verildiğinde gevşetici etki gösterdiği ortaya konmuştur (65). Bu gevşetici etkinin ise endotel bağımlı olmadığı, nitrik oksit (NO), prostaglandinler ve hidrojen peroksit ile ilişkisiz olduğu iddia edilmiştir. Dapagliflozinin endotel veya damar düz kas hücreleri üzerinden tonüs üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, fare aortunda dapagliflozinin artan dozlarda verilmesiyle birlikte endotelden bağımsız bir mekanizmayla vazorelaksasyon yaptığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada fare aortu



hiperglisemik ortamda incelendiğinde dapagliflozin inkübasyonunun hiperglisemiye bağlı etkilenen vazorelaksasyon cevaplarına koruyucu etkili olduğu da tespit edilmiştir (66). Empagliflozin, kanagliflozin ve dapagliflozinin topluca incelendiği başka bir çalışmada da hiperglisemik ortamda inkübe edilen fare aortunda bozulmuş asetilkolin gevşeme yanıtlarını düzeltici etkili oldukları ortaya konmuştur (63).

### **2.5. Hipotez**

Bu çalışmanın hipotezleri şunlardır:

1. LPS ile indüklenen sıçan sepsis modelinde renal arter dallarında fonksiyonel cevaplar bozulur.
2. LPS ile indüklenen sıçan sepsis modelinde empagliflozin tedavisinin bozulan arter fonksiyonel cevapları üzerine düzeltici etkisi vardır.
3. LPS ile indüklenen sıçan sepsis modelinde empagliflozin tedavisinin gelişen akut böbrek hasarında düzeltici etkisi vardır.

### **2.6. Amaç**

Bu çalışmada, LPS ile indüklenen sıçan sepsis modelinde oluşan akut böbrek hasarı üzerine empagliflozin tedavisinin etkileri araştırılacaktır. İzole böbrek damar yatağı, izole renal arter dalları ve izole torasik aortta fonksiyonel değişiklikler değerlendirilerek bu değişiklikler üzerine empagliflozin tedavisinin olası koruyucu etkileri incelenecektir. Ek olarak alınan böbrek, karaciğer ve ileum örnekleri ile empagliflozin tedavisinin model üzerindeki etkileri histopatolojik olarak değerlendirilecektir.

### 3. YÖNTEMLER

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada kullanılan hayvanlar Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Hacettepe Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın hayvan barınağına getirilen hayvanlar deney süreci boyunca uygun koşullarda barındırılmıştır. Hayvanların 18-21°C'de, %50-60 nem aralığında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık olacak koşulların sağlandığı ortamda, tüm deney süreci boyunca *ad libitum* standart laboratuvar yemi ve su ihtiyaçları karşılanarak barınmaları sağlanmıştır. Ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen 38 adet Sprague–Dawley soyu erkek sıçan kullanılmıştır. Dişi hayvanlarda menstrüel siklus sürecinde hormon düzeylerinde görülecek farklılıklar nedeniyle erkek sıçanlar tercih edilmiştir. Hayvanlar barınak sürecinde en az 5 gün ortama alışana kadar işlem yapılmamıştır.

#### 3.2. Etik Kurul İzni

Projenin etik kurul onayı Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28.12.2021 tarihli etik kurul toplantısında alınmıştır. Karar numarası 2021/10-09, sayısı 52338575-160 ve kayıt numarası 2021/81'dir. Alınan bu onay ile hayvan deneyleri Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, histopatolojik değerlendirme ise Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır.

#### 3.3. Deney Protokolü ve İlaç Uygulamaları

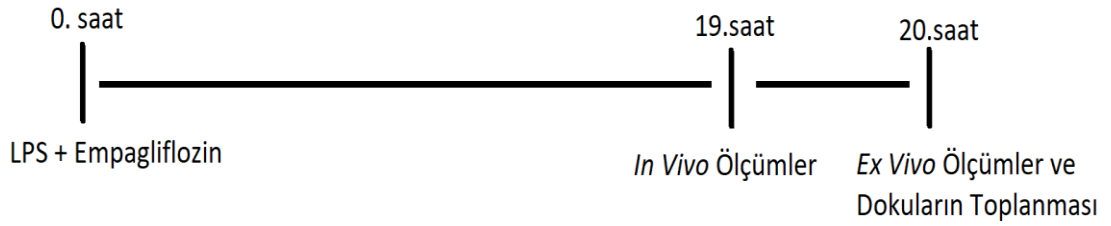
Deney protokolünde empagliflozin (BI 107730, MedChemExpress, Princeton, New Jersey, ABD), Escherichia coli'nin O55:B5 serotipine ait lipopolisakkarit (L2880, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), kloralhidrat (MERCK KGaA, Darmstadt, Almanya), fenilefrin (P6126, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), asetilkolin (A6625, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), anjiyotensin-II (176804, Calbiochem-Behring), sodyum nitroprusiyat (PHR1423, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD), norepinefrin (A7381, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD) kullanıldı.

Deneyler için toplam 4 grup tasarlandı, gruplar sırasıyla kontrol, LPS, LPS+Empagliflozin ve Empagliflozin olarak adlandırıldı. Yapılacak *in vivo* ölçümler için hayvanlara anestezi verilmesinden 19 saat önce gruplarına göre LPS ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) veya onun vehikülü olan salin (%0,9 NaCl) i.p. yoldan eşit hacimlerde ( $1 \text{ ml kg}^{-1}$ ) ve empagliflozin ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) veya onun vehikülü olan %2,4 DMSO içeren salin eş zamanlı olarak i.p. yoldan eşit hacimlerde ( $4 \text{ ml kg}^{-1}$ ) verildi. Enjeksiyonlar sonrası hayvanlar *in vivo* ölçümlere kadar aç bırakılarak takip edildi. Deneylerde kullanılan ilaçların dozlarına literatürdeki benzer çalışmalar kaynak alınarak karar verildi. Gruplarda i.p. olarak hangi ilacın yapıldığı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** Deney grupları ve deney protokolünde gruplara verilen ilaçlar

DENEY VE KONTROL GRUPLARI	LPS - $10 \text{ mg kg}^{-1}$	Empagliflozin - $10 \text{ mg kg}^{-1}$
Kontrol	Vehikül	Vehikül
LPS	LPS	Vehikül
LPS + Empagliflozin	LPS	Empagliflozin
Empagliflozin	Vehikül	Empagliflozin

İntraperitoneal enjeksiyonlardan 19 saat sonra hayvanlara kloralhidrat ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) ile anestezi uygulanıp önce *in vivo* ölçümler yapıldı ve ardından *ex vivo* değerlendirme için gerekli dokular çıkarılarak fonksiyonel ölçümler yapıldı. Dokular çıkarılmadan önce mesaneden idrar örneği alınarak idrar çubuğu ile glikoz ve lökosit miktarı kalitatif ölçüldü. Ayrıca histopatolojik değerlendirme için de hayvanların sağ böbrek, karaciğer ve ileum örnekleri alındı. Ek olarak hayvanların ağırlıkları 0. saat ve 19. saatte takip edilerek ağırlık kaybı ölçüldü.



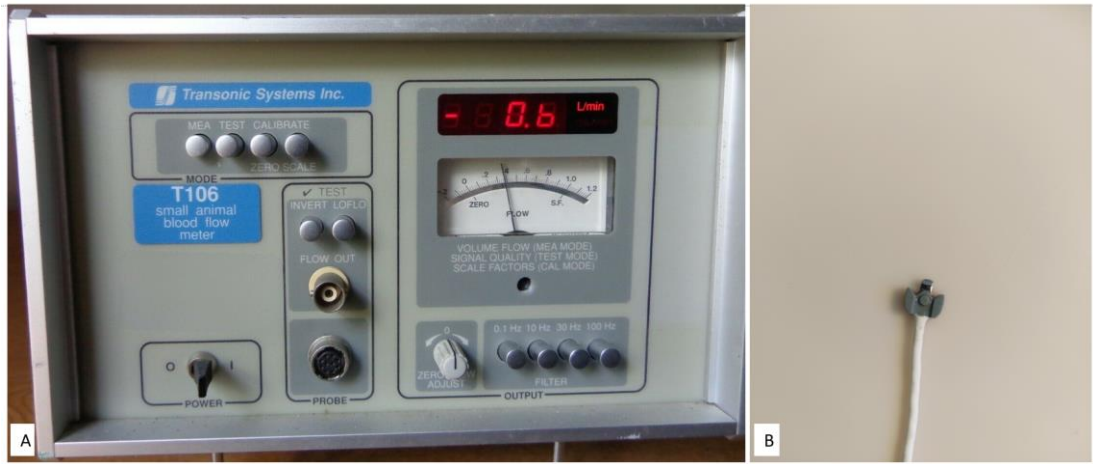
**Şekil 3.1** Deney protokolü

### 3.4 Fonksiyonel Değerlendirme

Fonksiyonel değerlendirmeler *in vivo* ve *ex vivo* deneyler olmak üzere iki farklı deneysel modelle incelendi.

#### 3.4.1 In vivo Deneysel Model

Fonksiyonel değerlendirmelerin *in vivo* kısmında, kloralhidrat ile anestezi verilen hayvanlarda anestezinin derinliği parmak kısırmaya yanıt ile değerlendirilerek cerrahi işlemlere başlandı. Hayvanın ensesinden cilt altına bir kesi yapılarak cilt altına yerleştirilen bir termometre probu ile vücut sıcaklığı takibi yapıldı. Sıcaklık takibine *in vivo* değerlendirme boyunca devam edildi. Hayvanın karın ön duvarı açıldıktan sonra renal arter, superior mezenter arter, portal ven etraf dokulardan izole edilerek ölçüme uygun hale getirildi. Renal arter kan akımı, superior mezenter arter kan akımı ve portal ven kan akımı, T106 küçük hayvan kan akım ölçer (Transonic Systems, ABD) cihazı ile sırasıyla ölçüldü. Ölçümlerde doppler ilkesiyle kan akımını ölçen bir damar probu kullanıldı.



**Şekil 3.2.** Kan akımı ölçümünde kullanılan cihaz ve prob. Transonic Systems T106 küçük hayvan kan akım ölçer (Small Animal Blood Flow Meter) (A). Damar probu, Perivascular Flow Probes, Transonic Systems (B).

Tüm gruplarda aşağıdaki parametreler *ex vivo* değerlendirmelere geçilmeden önce ölçüldü. Kan glikozu ölçümü kan akımı ölçümlerinden sonra, intaperitoneal enjeksiyondan sonraki 20. saatte kuyruktan yapılan bir kesi ile kuyruk veninden alınan kanın glukometre ile ölçülmesiyle yapıldı.

*In vivo* değerlendirme için aşağıdaki parametreler ölçüldü:

1. Renal arter kan akımı,
2. Superior mezenter arter kan akımı,
3. Portal ven kan akımı,
4. Kan glikozu değeri.

### 3.4.2. *Ex vivo* Deneysel Model

*Ex vivo* değerlendirmelerde izole perfüze böbrek düzeneğinde, miyograf ve organ banyosunda ölçümler yapıldı.

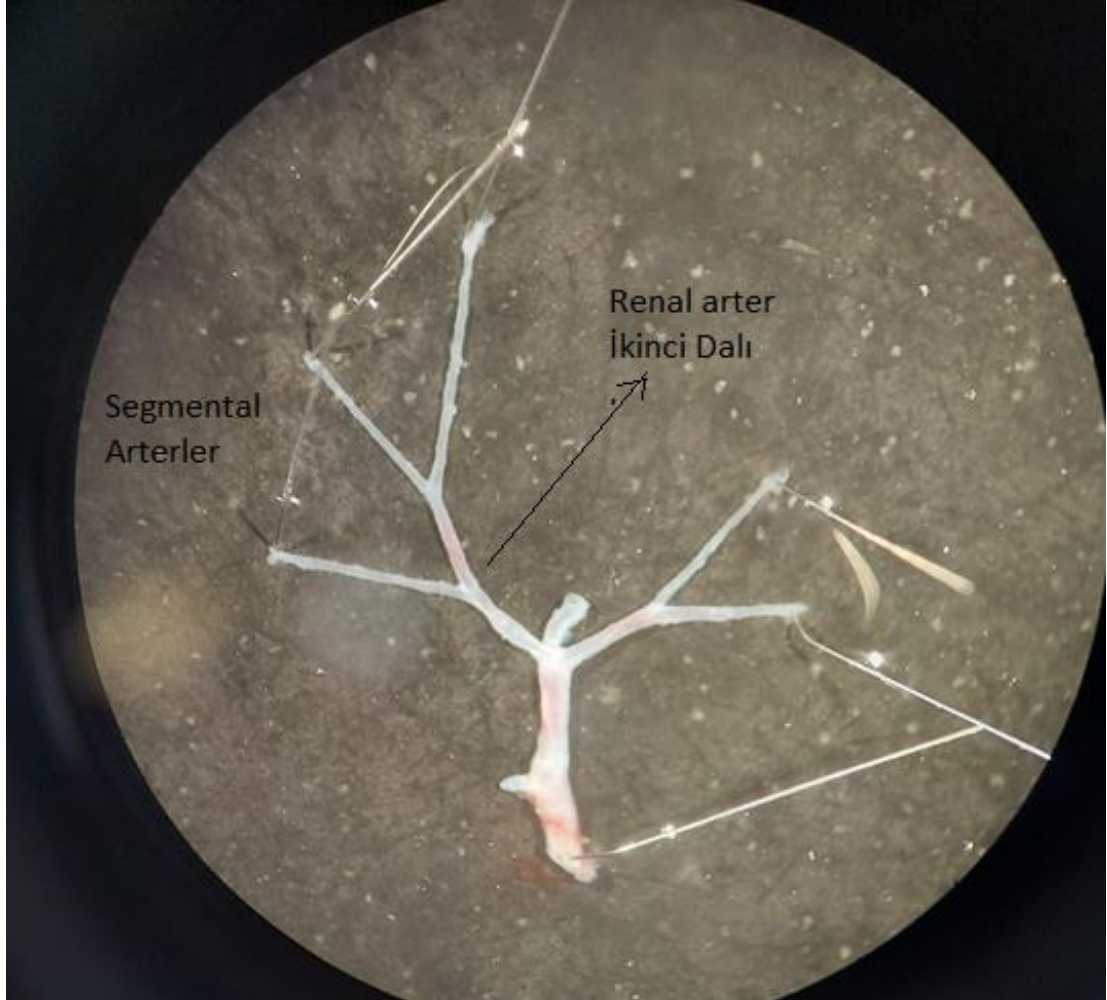
#### 3.4.2.1 İzole Perfüze Böbrek Düzeneği

Fonksiyonel ölçümlerin *ex vivo* kısmında, anestezi sonrasında, öncelikle hayvanın sol renal arteri etraf dokulardan izole edildi. Ardından aorta 24G kanül ile (i.v.) girilerek kanül renal artere doğru ilerletilip sabitlendi. Kanül renal arterdeyken

sabitletikten sonra sol böbrek Krebs–Henseleit solüsyonu (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> ve 11 mM glikoz) ile perfüze edildi. Devamında böbrek ve aortun kanül ile girilen kısmı etraf dokulardan ayrıldı ve bir bütün olarak kanülün ucundan ölçümler için kullanılacak perfüzyon sistemine baēlandı. Doku %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> karışımı ile gazlandırılmış 37° C sıcaklıktaki Krebs–Henseleit solüsyonu ile peristaltik bir pompa (MP-3 akım pompası, Eyela, Japonya) aracılıēıyla sabit hızda perfüze edildi. Sabit hızın deēeri laboratuvarında daha önce yapılan çalışmalar, literatürdeki bazal böbrek perfüzyon basıncı bilgileri ve yapılan ön çalışmalar ile belirlendi. Bu perfüzyon sistemi ile doku sabit bir akım ile perfüze edilirken böbrek damar yataēının sepsise ve ilaç tedavisine vereceēi yanıtın basınç transduseri aracılıēıyla ölçülmesi, ardından MP150 veri kazanım nitesi (Biopac Systems, ABD) aracılıēıyla bilgisayara aktararak deēerlendirilmesi planlandı. Bu amaçla vazokonstriktör (kasıcı) ajan olarak fenilefrin (PE), norepinefrin ve anjiyotensin-II, vazodilatör (gevşetici) ajan olarak ise asetilkolin ve sodyum nitroprusiyat (SNP) verilerek sepsisli böbrekte empagliflozin tedavisinin etkileri araştırıldı. Ayrıca perfüzyon sistemine asılan böbrek damar yataēında üreterden olan çıkış 30 dakika boyunca “ml” cinsinden ölçülerek üreter çıkışı üzerinden ayrı bir fonksiyonel deēerlendirme yapıldı. Üreter ıkışı deēerlendirmesinde çıkışın 0,5 ml/10 dakikadan az olduēu dokular literatür ile uyumlu şekilde kapsam dışı bırakıldı (67). İzole perfüze böbrek dzeneēi deneyler boyunca 6,8 ml/dk hızla perfüze edildi. Gevşeme yanıtları için kullanılan PE dozu 3x10<sup>-6</sup>M olup bu konsantrasyonu içeren Krebs–Henseleit solüsyonu ile doku perfüze edilerek n kasılma saēlandı ve gevşeme yanıtları alındı. Diēer kasıcı ajanlarla kıyaslamada kullanılan PE dozu ise 10 µg/0,1ml idi.

Fonksiyonel ölçümlerin *ex vivo* kısmının diēer bir aşamasında ise anestezi verilen hayvanlarda saē böbrek ve saē renal arter etrafındaki dokulardan ayrıldı. Saē böbrek önce yatay eksende boydan boya yapılan bir kesi ile ortadan ikiye ayrıldı. Ayrılan parçalardan biri histopatolojik inceleme için kullanılırken diēer parça mikroskop altında incelenerek renal arterin böbrek içine girdikten sonraki kısmı olan renal arterin ikinci dalı ile onun devamı niteliēindeki segmental arter izole edildi. Ek

olarak hayvanın göğüs boşluğu açılarak torasik aort izole edildi. Bu damarlar miyograf ve organ banyosuna asılarak değerlendirildi.



**Şekil 3.3.** Renal arter ve dallarının ışık mikroskopundaki görünümü. Renal arter, renal arterin ikinci dalı ve segmental arterler izole edilerek 40x büyütme sonrasında çekildi.

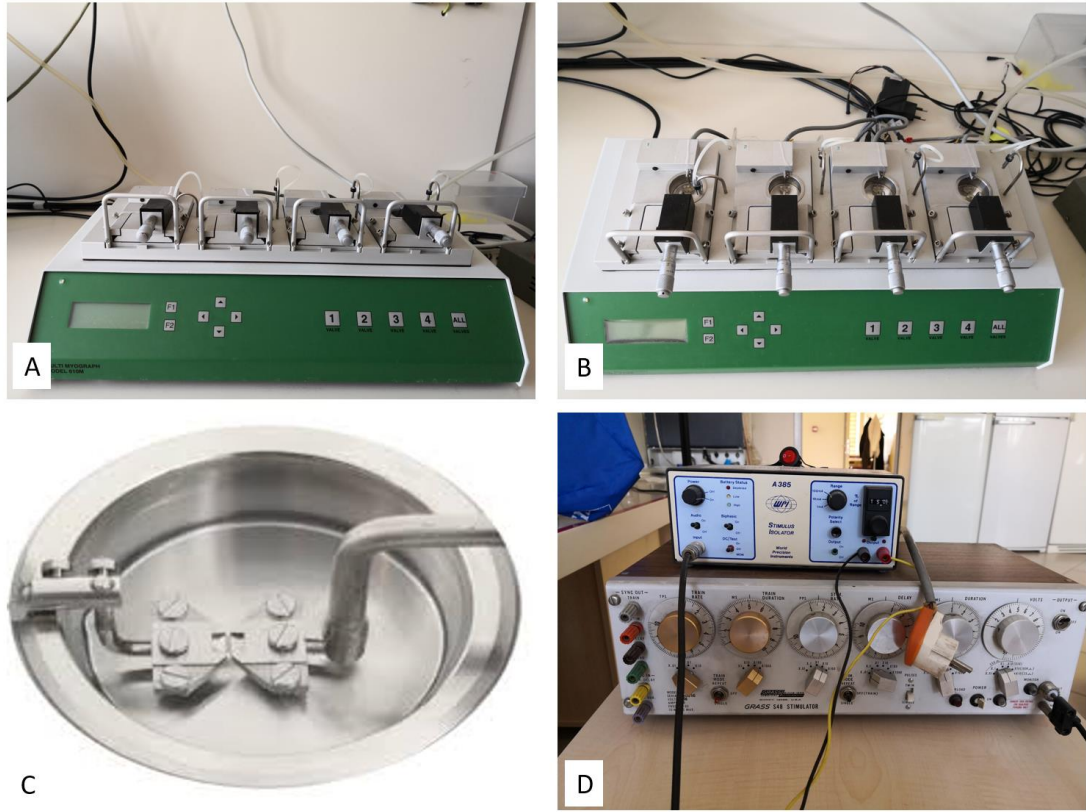
#### 3.4.2.2 Miyograf

İzole edilen renal arterin böbrek içindeki devamı olan renal arterin ikinci dalı ile bu damarın devamı olan segmental arter DMT-610M tel miyografıta (Danish Myo-Technology, Danimarka) ölçüm için ayrıldı. Verilerin bilgisayara aktarılmasında Powerlab veri kazanım ünitesi (AD Instruments, Avustralya) kullanıldı. Segmental arter için 25  $\mu\text{m}$  (mikrometre), renal arterin ikinci dalı için 40  $\mu\text{m}$  çapta teller kullanılarak bu arterlerin lümenlerinden endotele hasar vermeden tel geçirildi ve tellerin iki ucundan dokular fizyolojik tuz solüsyonu (PSS, physiological salt solution)

(118 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glikoz, 0,025 mM EDTA, 37°C) içeren miyograf banyolarına sabitlendi, daha sonra banyoların miyografa bağlantısı yapıldı. Dokulara normalizasyon işlemi uygulandı, bu sayede dokuların kıyaslanabilmesi için standardize edilmiş bir yöntem ile temel deney koşulları oluşturuldu ve dokulardan alınacak yanıtlar için en ideal gerim hesaplanarak dokular o gerime denk gelecek şekilde gerildi. Gerim teller arasındaki mesafe tellerin bağlı olduğu mikrometre üzerindeki değerlere göre ayarlandı. Normalizasyon işleminin ardından dokular 40 dakika boyunca dinlendirildi.

Dokuların dinlendirilmesinin ardından yüksek K<sup>+</sup> PSS (42,6 mM NaCl, 80 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glikoz, 0,025 mM EDTA) verildi ve tasarlanan protokolün uygulanmasına geçildi. Banyolara vazokonstriktör ajan olarak fenilefrin, anjiyotensin-II ve vazodilatör ajan olarak asetilkolin ve SNP verilerek sepsisin ve empagliflozin tedavisinin renal arterin ikinci dalı ve segmental arter üzerine olan etkileri karşılaştırılmalı incelendi. Fenilefrin ön kasılması sonrası ACh gevşeme yanıtları alındı, ön kasılmada kullanılan PE konsantrasyonu maksimum PE kasılmasının % 60-80 oranında kasılma yapacak konsantrasyon şeklinde belirlendi. SNP gevşeme yanıtları da AT-II kasılması sonrasında alındı. Ayrıca S48 elektriksel alan stimülatörü (Grass, ABD) ve A385 sabit akım ünitesi (World Precision Instruments, ABD) ile elektriksel alan stimülasyonu (EAS) yapılarak sepsiste ve empagliflozin tedavisinde elektriksel alan stimülasyonundaki değişimler değerlendirildi. Elektriksel alan stimülasyonu için kullanılan değerler ön denemeler sonucunda 8 miliamper akım, 10 saniye toplam süre, 1 milisaniye tek bir uyarı süresi olarak belirlendi. Stimülatör ile verilen uyarı sabit akım ünitesi üzerinden geçirilerek miyograf banyolarındaki platin elektrotlara verildi. Miyograf sisteminde damarların verdiği yanıtlar doku gerimi üzerinden değerlendirildi. Elde edilen verilerde verinin alındığı damarın uzunluğuna bağlı değişebilecek yanıtları önlemek, dokunun uzunluğunu bir değişken olarak ortadan kaldırıp daha güvenilir analiz yapabilmek amacıyla elde edilen veriler damar uzunluğuna oranlanarak mN/mm cinsinden verildi.





**Şekil 3.4.** Miyograf. Miyografin önden (A), üstten (B) görünüşü. Miyograf banyosu (C). Elektriksel alan stimülasyonu için kullanılan stimütatör ve sabit akım ünitesi (D).

### 3.4.2.3 Organ banyosu

İzole edilen torasik aort içerisinde tel geçirilerek sabitlendi ve Krebs-Henseleit solüsyonu içeren organ banyosuna asıldı. Verilerin bilgisayara aktarılmasında MP150 veri kazanım ünitesi kullanıldı. Dinlendirilen dokulara yüksek  $K^+$  Krebs-Henseleit solüsyonu (42,7 mM NaCl, 80mM KCl, 2,5 mM  $CaCl_2$ , 1,2 mM  $KH_2PO_4$ , 1,2 mM  $MgSO_4$ , 25 mM  $NaHCO_3$  ve 11 mM glikoz) verilerek ardından vazokonstriktör ajan olarak fenilefrin ve anjiyotensin-II, vazodilatör ajan olarak asetilkolin ve SNP verilerek sepsis ve empagliflozin tedavisinin etkileri incelendi. Organ banyosu sisteminde damarların verdiği yanıtlar doku gerimi üzerinden değerlendirildi.

### 3.5. İdrar Örneğinin Alımı, Histopatoloji için Örneklerin Toplanması

*Ex vivo* değerlendirme için dokuların çıkarılmasına başlanmadan önce doğrudan mesaneden enjektör ile idrar örneği alındı. İdrar örneklerinde ölçümler

kolorimetrik metodla idrar çubuklarıyla yapıldı. İdrar çubuğu idrar örneğine batırılıp 1 dakika bekletildi, çubukta ilgili kısımda oluşan renk değişiminin kit içindeki tablodan hangi sayısal aralığı temsil ettiğinin tespiti ile glikoz ve lökosit ölçümü yapıldı. Glikoz, lökosit ölçümü doğrudan bir sayısal değer verilerek değil, ölçümün glikoz ve lökosit için idrar çubuğu kitinde daha önceden belirlenmiş aralıklardan hangisine denk düştüğü şeklinde yapıldı.

*Ex vivo* ölçümler için dokuların izole edilmesinden sonra ise sağ böbrek, karaciğer ve ileum örnekleri etrafındaki diğer dokularından ayrılarak çıkarıldı. Çıkarılan dokular %10'luk tamponlu nötral formalin içinde bekletilerek histopatolojik inceleme için saklandı. Saklanan tüm dokular Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na götürülerek histopatolojik değerlendirme yapıldı.

### **3.6. Histopatolojik Değerlendirme**

Histopatolojik değerlendirme için formolde bekletilen örneklerden 4 mikron kalınlığında kesitler alınarak rutin hematoksilin-eozin boyaması yapıldı, ışık mikroskobu ile değerlendirme yapıldı. Histopatolojik değerlendirme için literatürdeki benzer çalışmalar incelenerek oluşturulan skorlama sistemleri kullanıldı (68-70). Histopatolojik değerlendirmede böbrekte ve diğer örnek alınan dokularda sepsis ile ilişkili değişikliklerin varlığı ve tedavi grubunda sepsis ilişkili değişikliklerde görülmesi beklenen olası düzelmelerin varlığı değerlendirildi. Histopatolojik analiz için kullanılan değerlendirme kriterleri tabloda gösterilmiştir.

**Tablo 3.2.** Böbrek histopatolojik değerlendirme kriterleri

<b>Patolojik Değişiklikler</b>	<b>Skorlama</b>
<p><u>Glomerül:</u></p> <p>(1) Kapiler dilatasyon ve konjesyon, kapsül boşluğunda kanama</p> <p>(2) Hücre proliferasyonu</p> <p>(3) Fibrozis</p> <p>(4) Hücre proliferasyonu / kapsül duvarında fibrozis ya da belirgin iskemik büzüşme</p> <p><u>Renal tübül:</u></p> <p>(1) Şişmiş epitel hücreleri</p> <p>(2) Epitel hücrelerinde dejenerasyon veya nekroz</p> <p>(3) Tübüler protein birikimi</p>	<p>0: Normal</p> <p>1: Glomerül (1) + Renal tübül (1)</p> <p>2: Glomerül (1) + Renal tübül (1) + Renal interstisyum (1)</p> <p>3: Glomerül (1) + Renal tübül (1)(2)(3) + interstisyum (1)(2)</p> <p>4: Glomerül (1)(2)(3)(4) + Renal tübül (2)(3) + interstisyum (1) (2)</p>

**Tablo 3.3.** Karaciğer histopatolojik değerlendirme kriterleri

Patolojik Değişiklikler	Skorlama
<u>Hepatosit:</u> (1) Şişmiş, azalmış hepatosit; karyoplazmada dağılma, berraklaşma (2) Karyoplazmada vakuol / dağılma (3) Asidofili (4) Nekrobiyotik odak /asidofilik nekroz (5) Masif nekroz/ köprüleşme nekrozu	0: Normal  1: Hepatosit (1)(2) + sinüsler (1)  2: Hepatosit (1)(2) + sinüsler (1)(2) + portal alanlar (1)
<u>Sinüsler:</u> (1) Dilate sinüsler (2) Kupffer hücrelerinde şişme ve hiperplazi	3: Hepatosit (3) + sinüsler (1)(2) + portal alanlar (1)(2)  4: Hepatosit (4)(5) + sinüsler (1)(2) + portal alanlar (1)(2)
<u>Portal alanlar:</u> (1) Fibroplazi (2) Belirgin inflamatuvar hücre infiltrasyonu	

İleum histopatolojik değerlendirmesi için iskemik değişikliklerin ileum mukozasındaki yaygınlığına bakıldı, yaygınlığın miktarına göre yüzde olarak değerlendirme yapıldı. Değerlendirme sırasında 3-5 farklı segmentten kesit alınarak histopatolojik inceleme yapıldı.

Histopatolojik değerlendirme sırasında çekilen mikro fotoğraflar için mikroskopta ileumda 100x büyütme, karaciğer ve böbrekte 200x büyütme uygulandı.

### 3.7 İstatistiksel Analiz

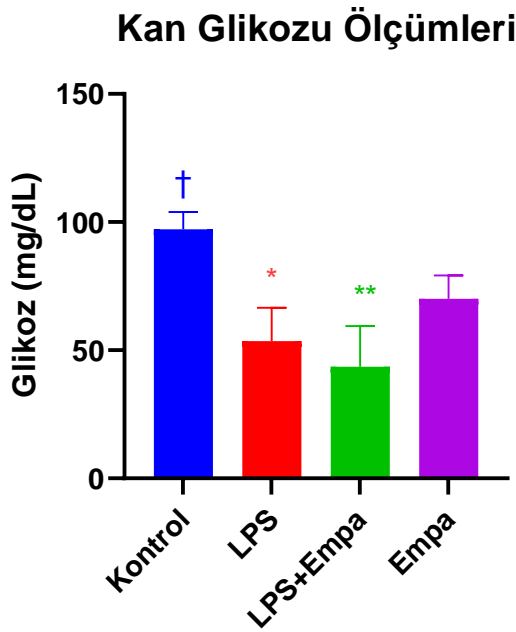
İstatistiksel analizler için Microsoft Excel 2019 ve Graphpad Prism 9.0.0 (121) yazılımları kullanıldı. Deneylerden elde edilen sonuçların analizinde konsantrasyon-cevap ve doz- cevap eğrilerinin karşılaştırılması için çift yönlü varyans analizi, diğerleri için tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma için post hoc Tukey veya Dunnett testleri tercih edildi. Skorlamaların karşılaştırılması için karşılık gelen non-parametrik testler kullanıldı. *P* değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın varlığı olarak değerlendirildi. Elde edilen veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak gösterildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1.Genel Değerlendirmeler

Empagliflozinin, sepsis ilişkili akut böbrek hasarı modelinde, fizyolojik ve renal fonksiyonlara etkisini genel olarak değerlendirmek amacıyla kan glikozu, ağırlık kaybı ölçümü, idrarda protein ve lökosit ölçümü yapıldı.

#### 4.1.1 Kan Glikozu Ölçümleri



**Şekil 4.1.** Kuyruk veni kan glikozu ölçüm sonuçları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , \*\* $p < 0,0021$ , † $p < 0,0332$  (n=5-7).

Anestezi verilen sıçanda anesteziden sonraki 1. saat, i.p. enjeksiyondan sonraki 20. saatte kuyruk veninden alınan örnekte glukometre ile kan glikoz ölçümü yapıldı. Yapılan ölçümlerde LPS grubunda kan glikozunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. LPS+Empa grubunda da kan glikozunun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı bulundu, (Kontrol: 97,14  $\pm$  6,793-, LPS: 53,50  $\pm$  13,04-, LPS+Empa: 43,50  $\pm$  15,95-, Empa: 70,00  $\pm$  9,235).

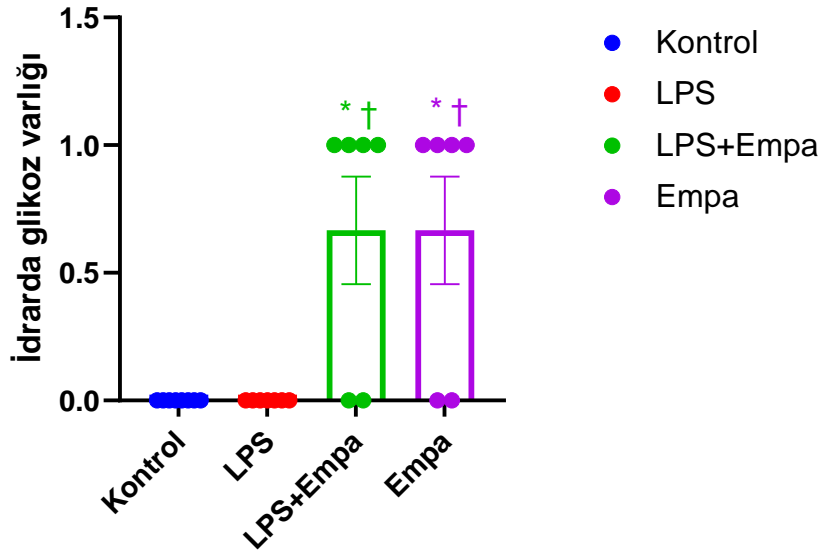
*Ex vivo* değerlendirmeler 6ncesinde, dokuların 6ıkarılmasına başlanmadan mesaneden enjekt6r ile alınan idrar 6rneği sonu6ları tablo ve grafik olarak aşağıda sunuldu.

**Tablo 4.1. İdrar Glikoz ve L6kosit 6l6meleri**

Grup	Sıra	Glikoz	L6kosit
Kontrol	1	YOK	1+
	2	YOK	YOK
	3	YOK	YOK
	4	YOK	YOK
	5	YOK	YOK
	6	YOK	YOK
	7	YOK	YOK
	8	YOK	YOK
Empa	1	2+	YOK
	2	YOK	YOK
	3	2+	YOK
	4	2+	YOK
	5	YOK	YOK
	6	1+	YOK
LPS	1	YOK	1+
	2	YOK	Yetersiz numune
	3	YOK	1+
	4	YOK	Yetersiz numune
	5	YOK	1+
	6	YOK	YOK
	7	YOK	1+
LPS+Empa	1	1+	YOK
	2	2+	1+
	3	1+	Yetersiz numune
	4	1+	YOK
	5	YOK	YOK
	6	YOK	Yetersiz numune

#### 4.1.2 İdrarda Glikoz Ölçümleri

### İdrar Glikoz Ölçümü



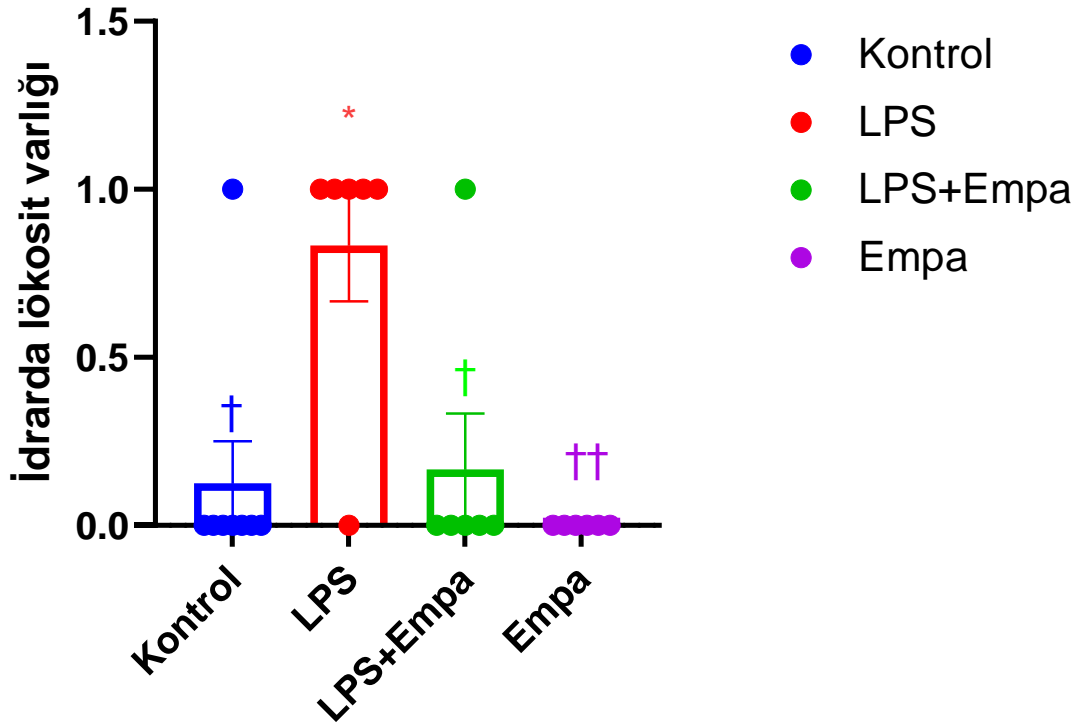
**Şekil 4.2.** İdrarda glikoz ölçümleri. İdrarda glikoz varlığı veya yokluğu değerlendirildi. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Kruskal-Wallis; çoklu karşılaştırmalar için Dunn post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , † $p < 0,0332$  (n=6-8).

Mesaneden alınan idrar örneklerinde kolorimetrik metodla idrar çubuklarıyla yapılan glikoz ölçümlerinde idrarda glikoz yokluğu 0, varlığı 1 kabul edildi. Empa verilmeyen gruplar olan kontrol ve LPS gruplarında hiçbir hayvanda idrarda glikoz varlığı tespit edilmedi. Kontrol grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve kontrol grubu ile Empa grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Aynı şekilde LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve LPS grubu ile Empa grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu, (Kontrol:  $0 \pm 0$ , LPS:  $0 \pm 0$ , LPS+Empa:  $0,6667 \pm 0,2108$ -, Empa:  $0,6667 \pm 0,2108$ ).



## 4.1.3. İdrarda Lökosit Ölçümleri

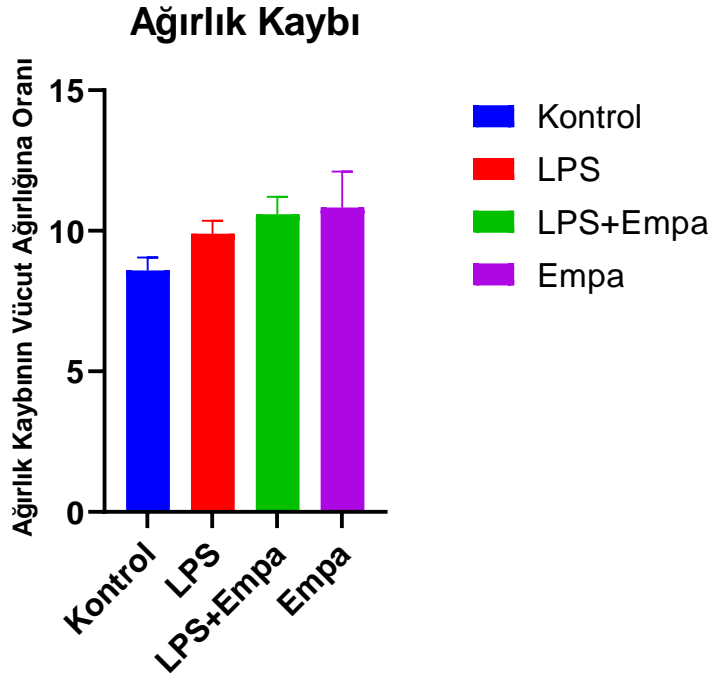
## İdrar Lökosit Ölçümü



**Şekil 4.3.** İdrarda lökosit ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Kruskal-Wallis; çoklu karşılaştırmalar için Dunn post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , † $p < 0,0332$ , †† $p < 0,0021$  (n=6-8).

İdrar örneklerinde yapılan lökosit ölçümlerinde idrarda lökosit yokluğu "0", varlığı "1" kabul edildi. LPS grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu, LPS grubunda idrarda lökosit miktarının arttığı tespit edildi. Kontrol grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve kontrol grubu ile Empa grubu arasında anlamlı fark bulunmadı, (Kontrol:  $0,125 \pm 0,125-$ , LPS:  $0,833 \pm 0,166-$ , LPS+Empa:  $0,166 \pm 0,166-$ , Empa:  $0 \pm 0$ ).

#### 4.1.4. Vücut Ağırlık Kaybı Ölçümleri



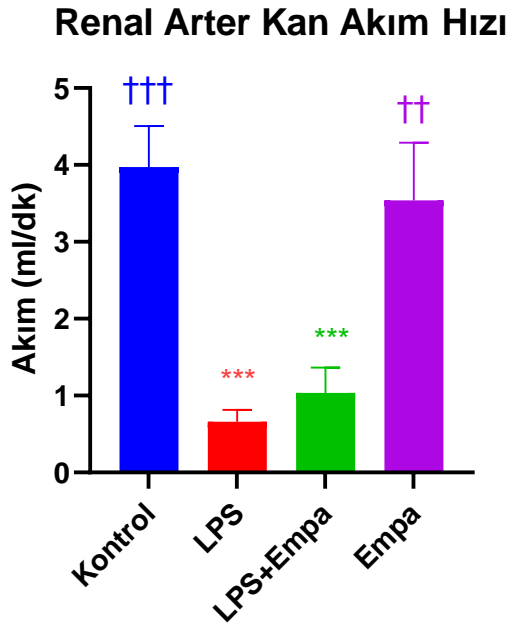
**Şekil 4.4.** Ağırlık kaybının vücut ağırlığına oranı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=5-8).

Hayvanların başlangıç ve 19. saatteki ağırlıkları ölçülerek ağırlık kaybı hesaplandı. Ağırlık kaybının hayvanın 0. saat ağırlığına oranlanarak yapılan değerlendirmelerde gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi, (Kontrol:  $8,589 \pm 0,4595$ -, LPS:  $9,888 \pm 0,4663$ -, LPS+Empa:  $10,59 \pm 0,6249$ -, Empa:  $10,83 \pm 1,274$ ).

## 4.2. Fonksiyonel Değerlendirmeler

### 4.2.1. *In Vivo* Ölçümler

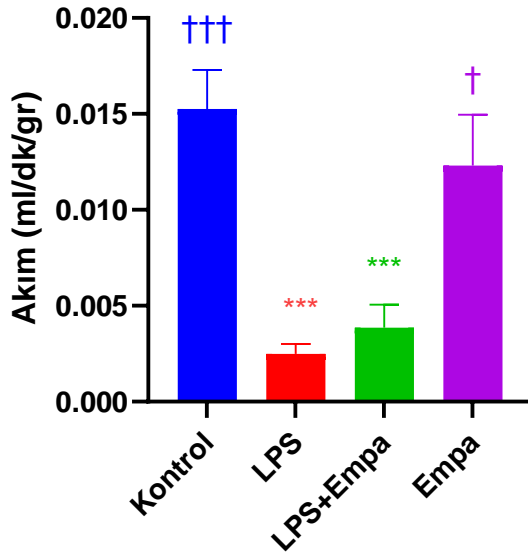
#### 4.2.1.1. Renal Arter Kan Akımı Ölçümü Sonuçları



**Şekil 4.5.** Renal arter kan akım hızı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\* $p < 0,0002$ , †† $p < 0,0021$ , ††† $p < 0,0002$  (n=5-9).

Anestezi altındaki hayvanda yapılan kan akımı ölçümlerinde LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda renal arter kan akım hızının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Empa grubunda kan akım hızının LPS grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğu tespit edilirken LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve kontrol grubu ile Empa grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi, (Kontrol:  $3,972 \pm 0,5346$ , LPS:  $0,660 \pm 0,1528$ -, LPS+Empa:  $1,033 \pm 0,3323$ -, Empa:  $3,540 \pm 0,7501$ ).

### Renal Arter Kan Akım Hızının Vücut Ağırlığına Oranı

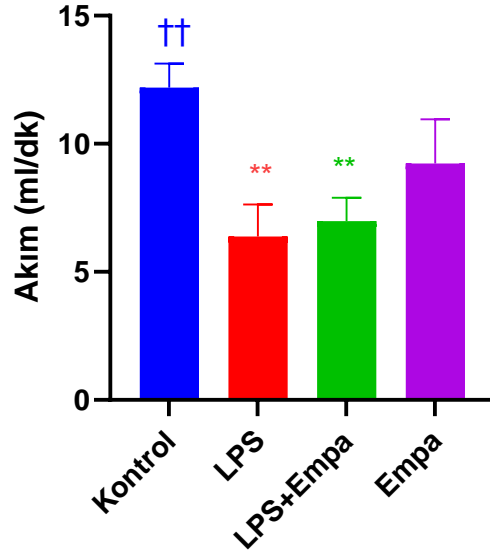


**Şekil 4.6.** Renal arter vücut ağırlığına oranlı kan akım hızı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\* $p < 0,0002$ , † $p < 0,0332$ , ††† $p < 0,0002$  (n=5-9).

Yapılan renal arter akım hızı ölçümleri hayvan ağırlığına oranlanarak değerlendirildiğinde LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda renal arter kan akım hızının kontrol grubuna göre aynı anlamlılık derecesinde azaldığı tespit edildi. Empa grubunda kan akım hızının LPS grubuna göre anlamlı şekilde fazla olduğu tespit edilirken kan akım hızı ağırlığa oranlandığında bu farkın anlamlılık derecesinin azaldığı görüldü. LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve kontrol grubu ile Empa grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi, (Kontrol: 0,0153  $\pm$  0,0020, LPS: 0,0025  $\pm$  0,0005-, LPS+Empa: 0,0039  $\pm$  0,0012-, Empa: 0,0123  $\pm$  0,0027).

#### 4.2.1.2. Superior Mezenter Arter Kan Akımı Ölçümü Sonuçları

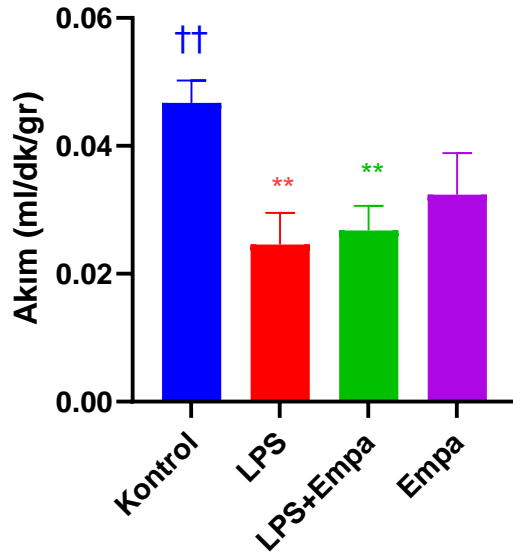
### Superior Mezenter Arter Kan Akım Hızı



**Şekil 4.7.** Superior mezenter arter kan akım hızı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama±ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\* $p<0,0021$ , †† $p<0,0021$  (n=5-9).

Anestezi altındaki hayvanda yapılan superior mezenter kan akımı ölçümlerinde LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda kan akım hızının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve kontrol grubu ile Empa grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi, (Kontrol: 12,19 ± 0,9401, LPS: 6,380 ± 1,254-, LPS+Empa: 6,975 ± 0,9212-, Empa: 9,230 ± 1,721).

### Superior Mezenter Arter Kan Akım Hızının Vücut Ağırlığına Oranı

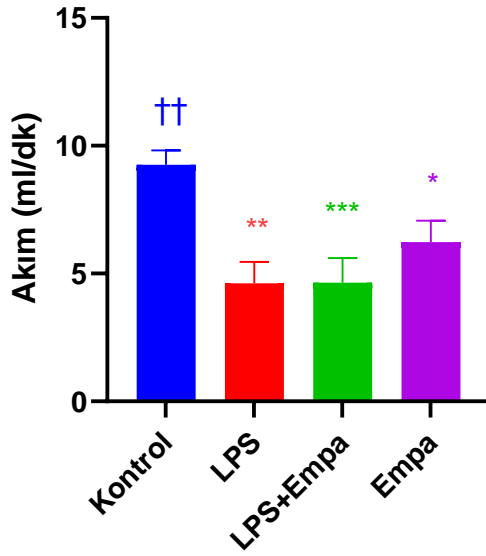


**Şekil 4.8.** Superior mezenter arter vücut ağırlığına oranlı kan akım hızı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\* $p < 0,0021$ , †† $p < 0,0021$  (n=5-9).

Anestezi altındaki hayvanda yapılan superior mezenter kan akımı ölçümleri hayvan vücut ağırlığına oranlanarak değerlendirildiğinde aynı şekilde LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda kan akım hızının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Yine aynı şekilde LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve kontrol grubu ile Empa grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi, (Kontrol:  $0,0467 \pm 0,0035$ , LPS:  $0,0246 \pm 0,0049$ -, LPS+Empa:  $0,0268 \pm 0,0038$ -, Empa:  $0,0324 \pm 0,0065$ ).

#### 4.2.1.3. Portal Ven Kan Akımı Ölçümü Sonuçları

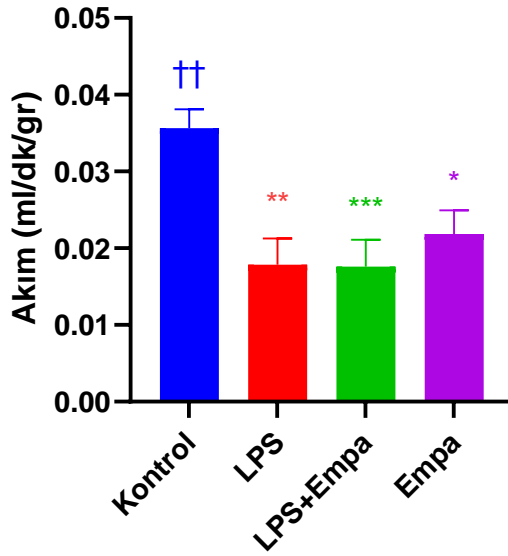
##### Portal Ven Kan Akım Hızı



**Şekil 4.9.** Portal ven kan akım hızı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , \*\* $p < 0,0021$ , \*\*\* $p < 0,0002$ , †† $p < 0,0021$  (n=5-9).

Anestezi altındaki hayvanda yapılan portal ven kan akımı ölçümlerinde LPS grubunda, LPS+Empa grubunda ve Empa grubunda portal ven kan akım hızının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve LPS grubu ile Empa grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi, (Kontrol:  $9,250 \pm 0,5734-$ , LPS:  $4,620 \pm 0,8387-$ , LPS+Empa:  $4,650 \pm 0,9580-$ , Empa:  $6,230 \pm 0,8372$ ).

### Portal Ven Kan Akım Hızının Vücut Ağırlığına Oranı



**Şekil 4.10.** Portal ven vücut ağırlığına oranlı kan akım hızı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , \*\* $p < 0,0021$ , \*\*\* $p < 0,0002$ , †† $p < 0,0021$  (n=5-9).

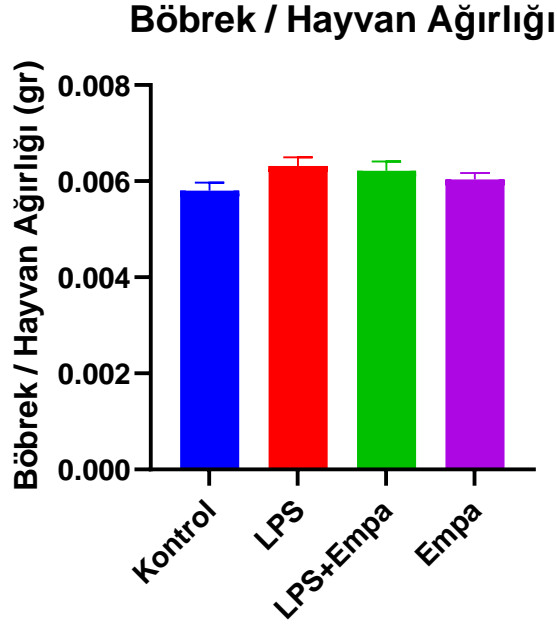
Anestezi altındaki hayvanda yapılan portal ven kan akımı ölçümleri hayvan ağırlığına oranlandığında aynı şekilde LPS grubunda, LPS+Empa grubunda ve Empa grubunda portal ven kan akım hızının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında ve LPS grubu ile Empa grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi, (Kontrol:  $0,0356 \pm 0,0025$ -, LPS:  $0,0178 \pm 0,0034$ -, LPS+Empa:  $0,0176 \pm 0,0035$ , Empa:  $0,0218 \pm 0,0031$ ).



#### 4.2.2. Ex Vivo Ölçümler

##### 4.2.2.1. İzole Perfüze Böbrek Düzeneği Sonuçlar

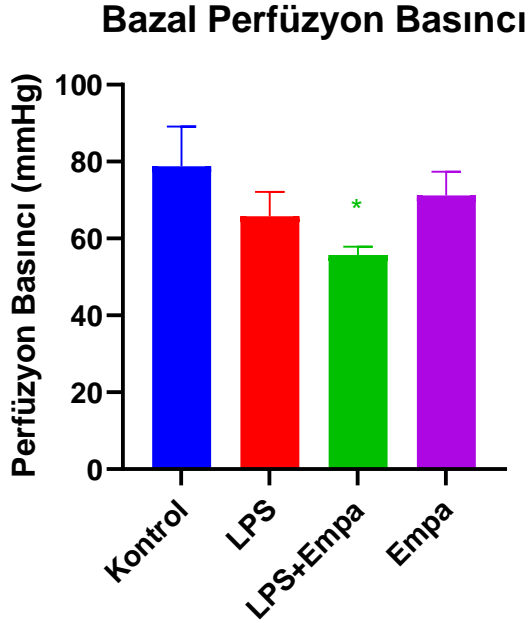
##### 4.2.2.1.1. Böbrek Ağırlığının Hayvan Vücut Ağırlığına Oranı



**Şekil 4.11.** İzole perfüze böbrek düzeneği böbrek ağırlığı / hayvan vücut ağırlığı ölçümleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-9).

İzole perfüze böbrek düzeneğinde kullanılan böbrek ağırlığının ölçülerek hayvanın ağırlığına oranlanması ile yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, (Kontrol: 0,0058  $\pm$  0,0002, LPS: 0,0063  $\pm$  0,0002-, LPS+Empa: 0,0062  $\pm$  0,0002-, Empa: 0,0060  $\pm$  0,0001).

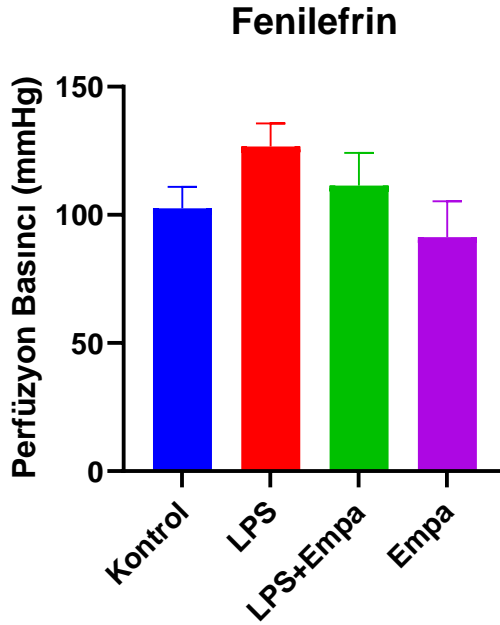
#### 4.2.2.1.2. Bazal Perfüzyon Basıncı



**Şekil 4.12.** İzole perfüze böbrek düzeneği bazal basınç düzeyleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık  $*p < 0,0332$  (n=6-9).

İzole perfüze böbrek düzeneğine bağlı olan böbrekte ölçülen bazal perfüzyon basıncı değerleri ile yapılan istatistiksel analizde LPS+Empa grubunda bazal perfüzyon basıncının kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Kontrol grubu ile LPS grubu arasında, kontrol grubu ile Empa grubu arasında ve LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında anlamlı fark görülmedi, (Kontrol:  $78,82 \pm 10,31$ , LPS:  $65,79 \pm 6,363$ -, LPS+Empa:  $55,70 \pm 2,144$ -, Empa:  $71,23 \pm 6,182$ ).

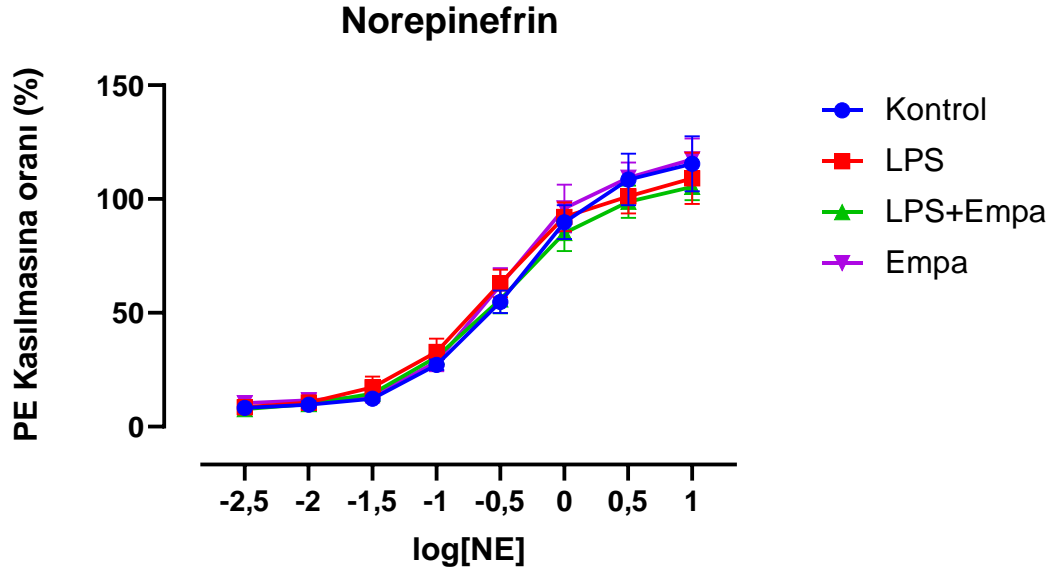
#### 4.2.2.1.1.3. Fenilefrin



**Şekil 4.13.** İzole perfüze böbrek düzeneği tek doz (10 µg/0,1ml) fenilefrin yanıtları. Veriler aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-8).

İzole perfüze böbrek düzeneğinde diğer kasıcı ajanlar ile kıyaslamada da kullanılan 10µg/0,1ml tek doz fenilefrin yanıtları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, (Kontrol: 102,5 ± 8,410, LPS: 126,7 ± 9,026-, LPS+Empa: 111,4 ± 12,75-, Empa: 91,25 ± 14,03).

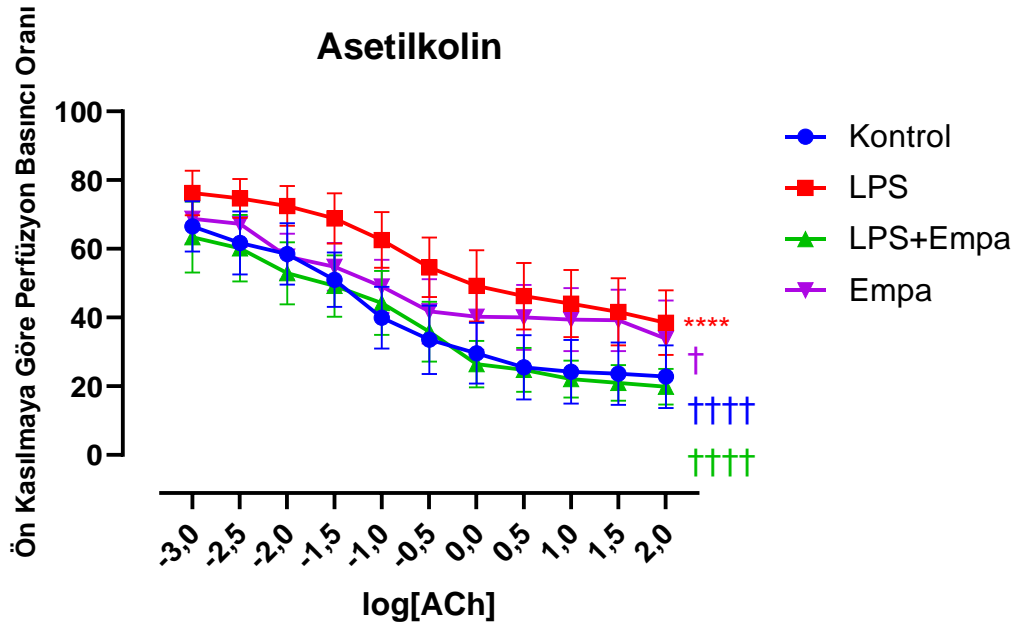
## 4.2.2.1.4. Norepinefrin



**Şekil 4.14.** İzole perfüze böbrek düzeneği norepinefrin yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-7).

İzole perfüze böbrek düzeneği norepinefrin yanıtları tek doz (10 $\mu$ g/0,1ml) fenilefrin kasılmasına oranlanarak incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

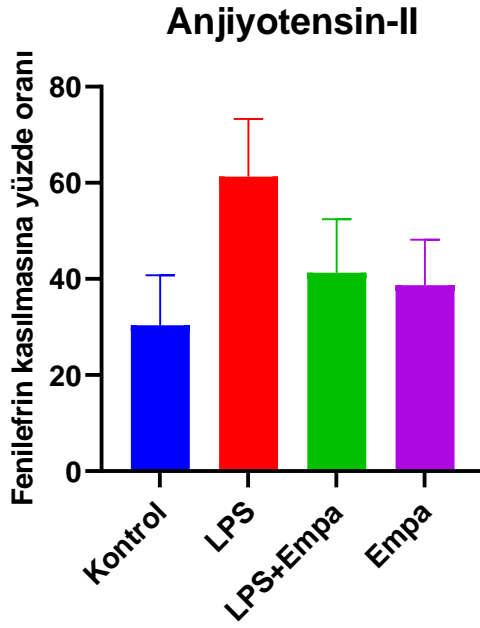
## 4.2.2.1.5. Asetilkolin



**Şekil 4.15.** İzole perfüze böbrek düzeneği asetilkolin yanıtları.  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  PE ön kasılması sonrasında alınmıştır. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , † $p < 0,0332$ , †††† $p < 0,0001$  (n=6-8).

İzole perfüze böbrekte  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  PE ön kasılması ile alınan ACh yanıtları incelendiğinde LPS grubunda gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı görüldü. LPS grubundaki bu azalmanın LPS+Empa ve Empa grupları ile kıyaslandığında da anlamlı olduğu görüldü.

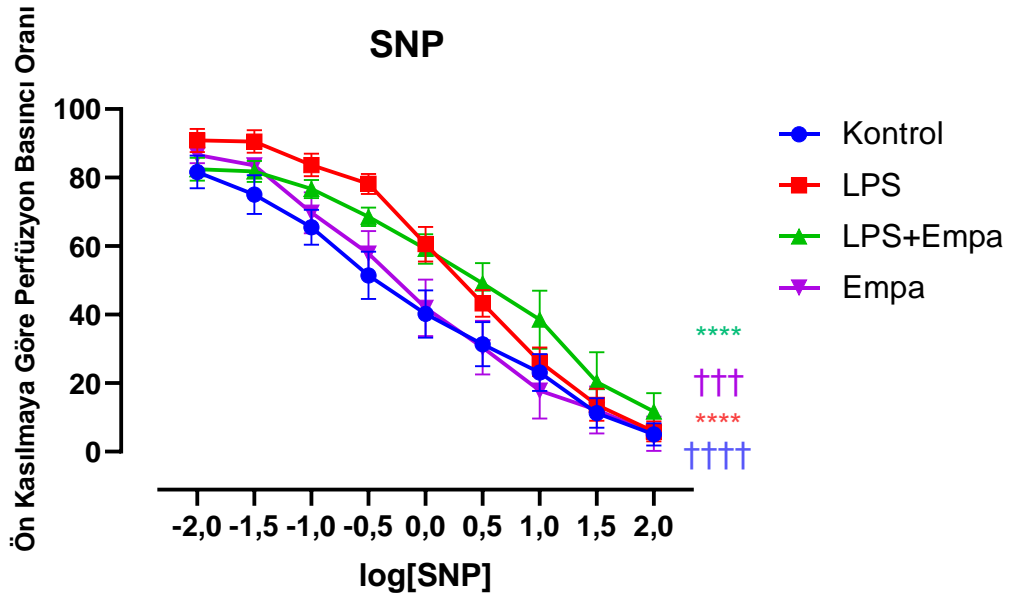
#### 4.2.2.1.6. Anjiyotensin-II



**Şekil 4.16.** İzole perfüze böbrek düzeneği anjiyotensin-II yanıtları. Tek doz (0,1µg/0,1ml) AT-II verildi. Veriler aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-8).

İzole perfüze böbrek düzeneği tek doz (0,1µg/0,1ml) AT-II yanıtları PE kasılmasına kıyaslanarak değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, (Kontrol: 30,34 ± 10,43, LPS: 61,29 ± 12,02-, LPS+Empa: 41,29 ± 11,14-, Empa: 38,67 ± 9,512).

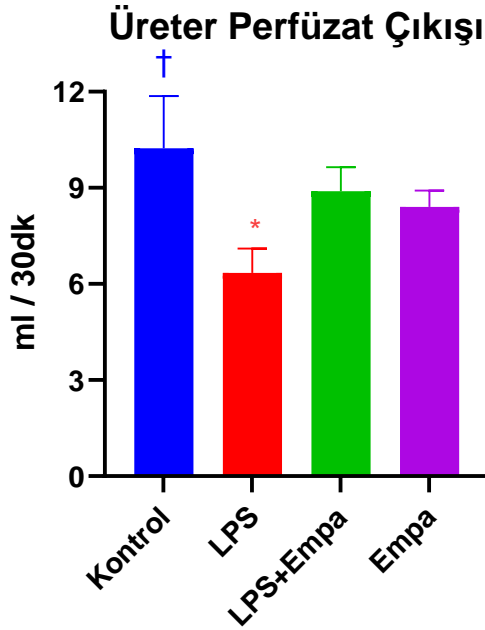
## 4.2.2.1.7. SNP



**Şekil 4.17.** İzole perfüze böbrek düzeneği SNP yanıtları.  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  PE ön kasılması ile alındı. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, + LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , +++ $p < 0,0002$ , ++++ $p < 0,0001$  (n=6-7).

İzole perfüze böbrek düzeneğinde  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  PE ön kasılması ile alınan SNP yanıtları değerlendirildiğinde LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda SNP gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna kıyasla azaldığı tespit edildi. LPS grubunda gevşeme yanıtları Empa grubu ile kıyaslandığında da anlamlı olarak azalırken LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında veya kontrol grubu ile Empa grubu arasında fark görülmedi.

#### 4.2.2.1.8. Üreter Perfüzet Çıkışı



**Şekil 4.18.** İzole perfüze böbrek düzeneği üreter perfüzet çıkışı ölçümleri. Ölçümler böbrek 6,8 ml/dk hızla perfüze edilirken alınmıştır. Veriler aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , † $p < 0,0332$  (n=5-9).

İzole perfüze böbrek düzeneğinde 30 dakika boyunca 6,8 ml/dk hızla perfüze edilen böbrekten ölçülen üreter çıkışı ölçümlerinde LPS grubunda üreter çıkışının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı bulundu. LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Aynı şekilde Empa ile kontrol grubu veya LPS grubu arasında da anlamlı fark tespit edilmedi, (Kontrol: 10,24 ± 1,628-, LPS: 6,343 ± 0,7638-, LPS+Empa: 8,894 ± 0,7528-, Empa: 8,405 ± 0,5133).

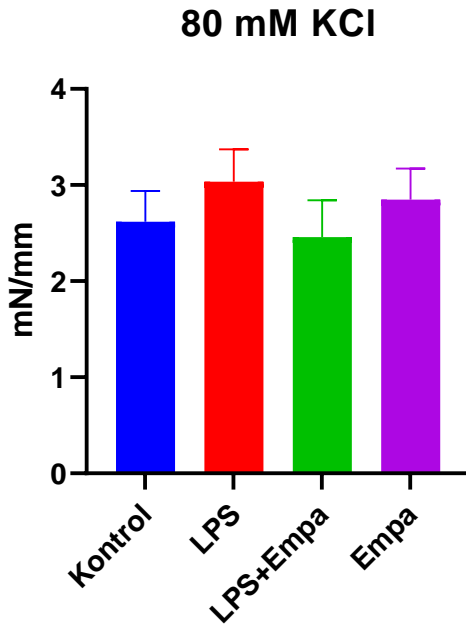


#### 4.2.2.2. Miyograf Sonuçları

Renal arterden devamındaki dallara doğru giderken arter çapları giderek küçüldü. Renal arter çapı 900-1000  $\mu\text{m}$  iken renal arterin ikinci dalının çapı 350-500, segmental arterin çapı 250-300  $\mu\text{m}$  arasındaydı.

##### 4.2.2.2.1. Renal Arterin İkinci Dal Sonuçları

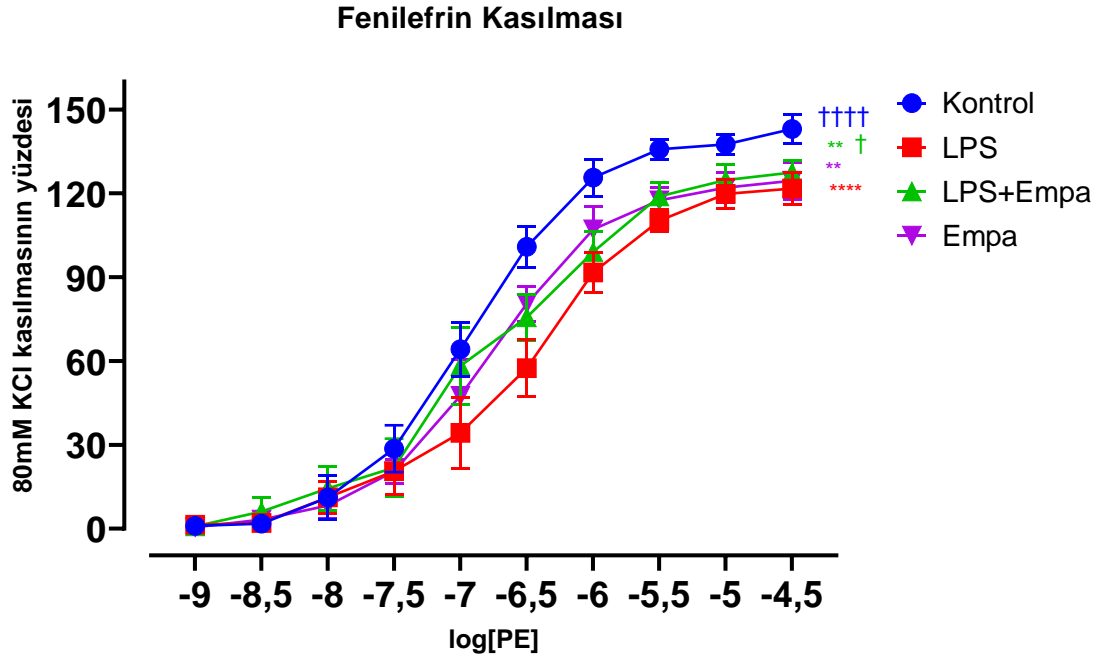
###### 4.2.2.2.1.1. 80 mM KCl Kasılması



**Şekil 4.19.** Renal arterin ikinci dalında 80 mM KCl yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-14).

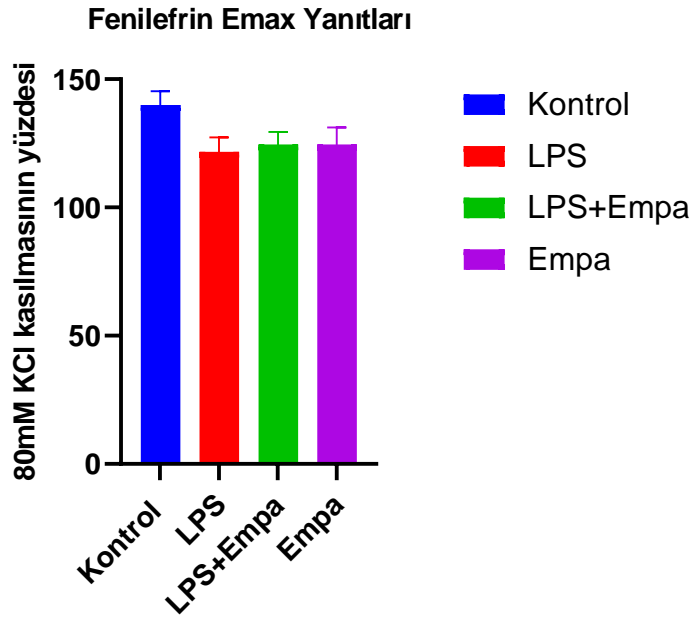
Miyografda renal arter ikinci dalı ile yapılan 80 mM KCl yanıtları değerlendirmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, (Kontrol: 2,619  $\pm$  0,3192-, LPS: 3,034  $\pm$  0,3367-, LPS+Empa: 2,459  $\pm$  0,3820-, Empa: 2,850  $\pm$  0,3220).

## 4.2.2.2.1.2. Fenilefrin Kasılması



**Şekil 4.20.** Renal arterin ikinci dalında fenilefrin yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\* $p < 0,0021$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , † $p < 0,0332$ , †††† $p < 0,0001$  (n=6-8).

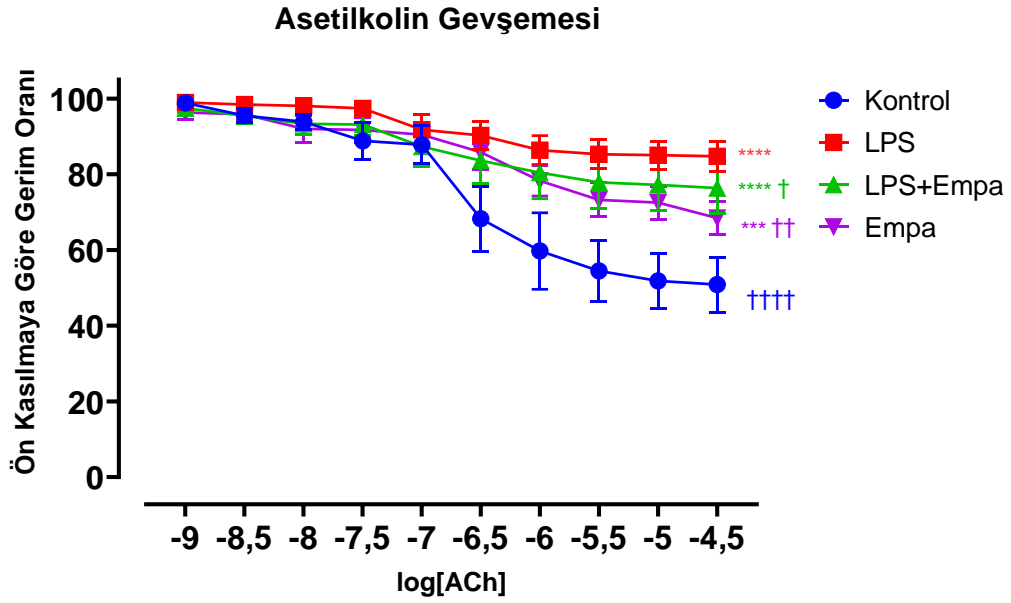
Renal arter ikinci dalı fenilefrin kasılma yanıtları incelendiğinde LPS grubunda, LPS+Empa grubunda ve Empa grubunda kontrole göre fenilefrin kasılma cevaplarının anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Ayrıca LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında da anlamlı fark olduğu, LPS+Empa grubunda kasılma yanıtlarının anlamlı şekilde geri arttığı görüldü.



**Şekil 4.21.** Renal arterin ikinci dalında fenilefrin maksimum yanıtları (Emax). Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=5-8).

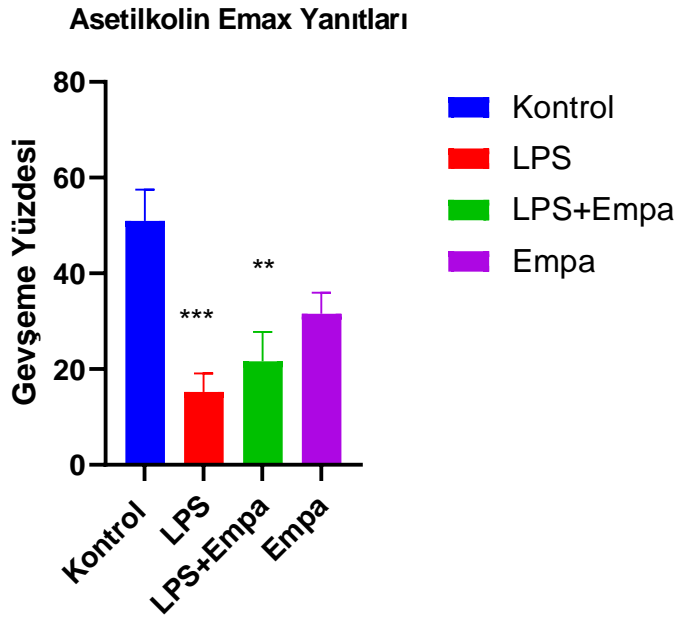
Renal arter ikinci dalı fenilefrin Emax yanıtlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol: 139,902  $\pm$  5,42-, LPS: 121,707  $\pm$  5,564-, LPS+Empa: 124,534  $\pm$  4,873-, Empa: 124,526  $\pm$  6,638).

## 4.2.2.2.1.3. Asetilkolin Gevşemesi



**Şekil 4.22.** Renal arterin ikinci dalında asetilkolin yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\* $p < 0,0002$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , † $p < 0,0332$ , †† $p < 0,0021$ , †††† $p < 0,0001$  (n=6-8).

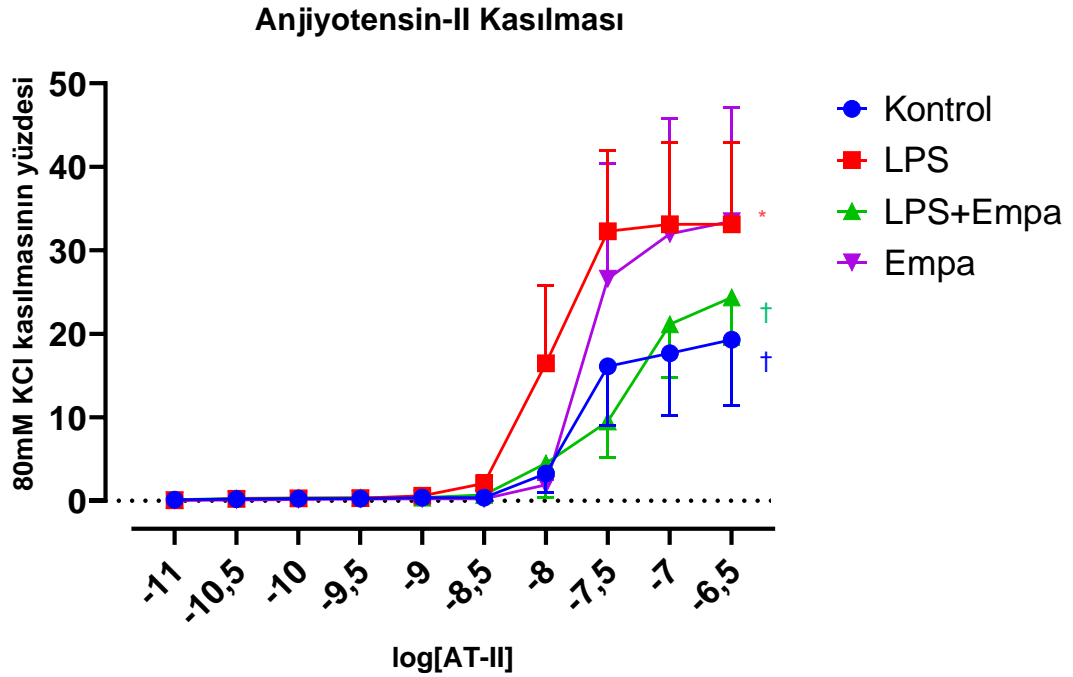
Renal arter ikinci dalında asetilkolin yanıtlarına bakıldığında LPS grubunda, LPS+Empa grubunda ve Empa grubunda kontrole göre asetilkolin gevşeme cevaplarının anlamlı şekilde azaldığı görüldü. LPS grubunda görülen gevşeme yanıtı azalmasının LPS+Empa ile Empa gruplarına göre de anlamlı olduğu tespit edildi.



**Şekil 4.23.** Renal arterin ikinci dalında asetilkolin Emax yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, \*\* $p < 0,0021$ , \*\*\* $p < 0,0002$  (n=5-8).

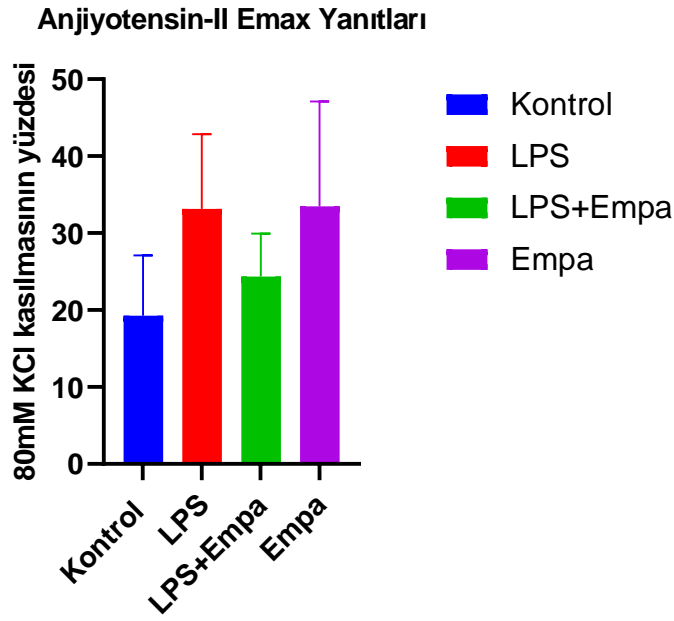
Renal arter ikinci dalı asetilkolin Emax yanıtlarına bakıldığında LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda Emax yanıtlarının kontrol grubuna göre azaldığı görüldü (Kontrol:  $50,95 \pm 6,539$ -, LPS:  $15,263 \pm 3,864$ -, LPS+Empa:  $21,659 \pm 6,074$ -, Empa:  $31,553 \pm 4,432$ ).

#### 4.2.2.2.1.4. Anjiyotensin-II Kasılması



**Şekil 4.24.** Renal arterin ikinci dalında anjiyotensin-II yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık \* $p < 0,0332$ , † $p < 0,0332$  (n=6-8).

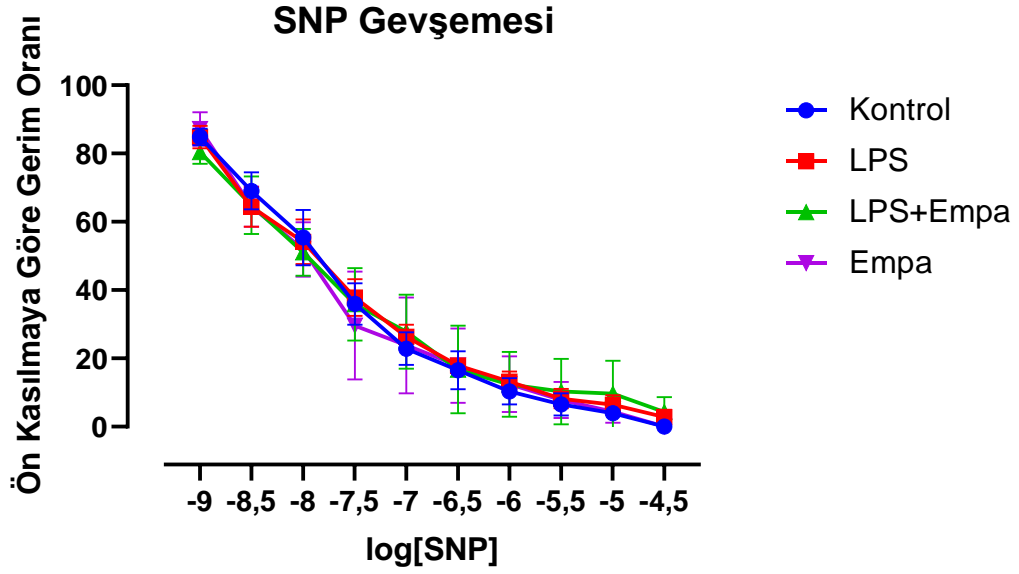
Renal arter ikinci dalı AT-II yanıtlarında LPS grubunda kontrol grubuna ve LPS+Empa grubuna göre AT-II kasılma cevaplarının anlamlı şekilde arttığı görüldü. Empa grubu ile kontrol grubu veya LPS grubu arasında fark görülmedi.



**Şekil 4.25.** Renal arterin ikinci dalında anjiyotensin-II Emax yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-8).

Renal arter ikinci dalında AT-II Emax yanıtlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol: 19,279  $\pm$  7,828-, LPS: 33,127  $\pm$  9,729-, LPS+Empa: 24,352  $\pm$  5,593-, Empa: 33,468  $\pm$  13,634).

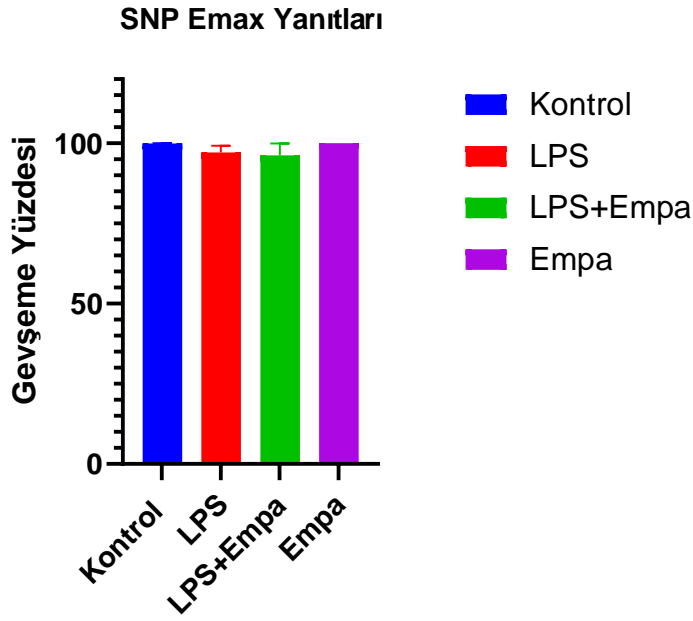
## 4.2.2.2.1.5. SNP Gevşemesi



**Şekil 4.26.** Renal arterin ikinci dalında SNP yanıtları. SNP yanıtları AT-II kasılması sonrasında alındı. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-8).

Renal arter ikinci dalında anjiyotensin-II kasılması sonrası SNP gevşeme yanıtları incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.

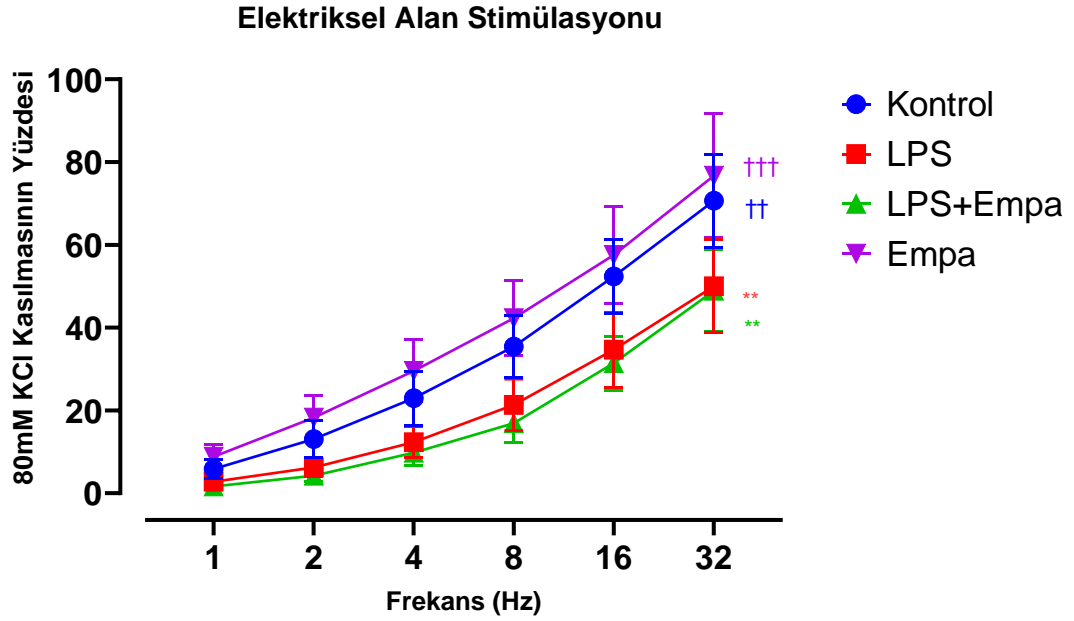




**Şekil 4.27.** Renal arterin ikinci dalında SNP Emax yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=4-7).

Renal arter ikinci dalı SNP Emax yanıtlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol: 115,809  $\pm$  9,124-, LPS: 99,252  $\pm$  3,12-, LPS+Empa: 123,366  $\pm$  12,559-, Empa: 131,163  $\pm$  17,059).

#### 4.2.2.2.1.6. Elektriksel Alan Stimülasyonu

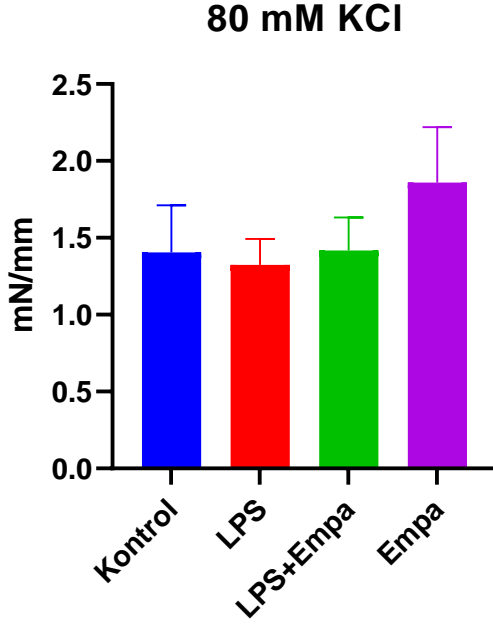


**Şekil 4.28.** Renal arterin ikinci dalının elektriksel alan stimülasyonu yanıtları. EAS parametreleri 8 miliamper, 10 saniye toplam süre, 1 milisaniye uyarı süresi. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\* $p < 0,0021$ , †† $p < 0,0021$ , ††† $p < 0,0002$  (n=6-8).

Renal arter ikinci dalında 8 miliamper akım, 10 saniye toplam süre, 1 milisaniye tek bir uyarının süresi olacak şekilde elektriksel alan parametreleri ayarlanarak 1'den 32'ye kadar artan frekanslarda uyarılar oluşturuldu. Bu uyarılara dokunun verdiği kasılma yanıtları 80mM KCl kasılmasına oranlanarak incelendiğinde LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda kontrol grubuna göre EAS ilişkili kasılma yanıtlarının azaldığı görüldü, LPS grubundaki azalmanın Empa grubuna göre de anlamlı olduğu görüldü. LPS ve LPS+Empa grupları arasında fark bulunmadı.

#### 4.2.2.2 Böbrek Segmental Arter Sonuçları

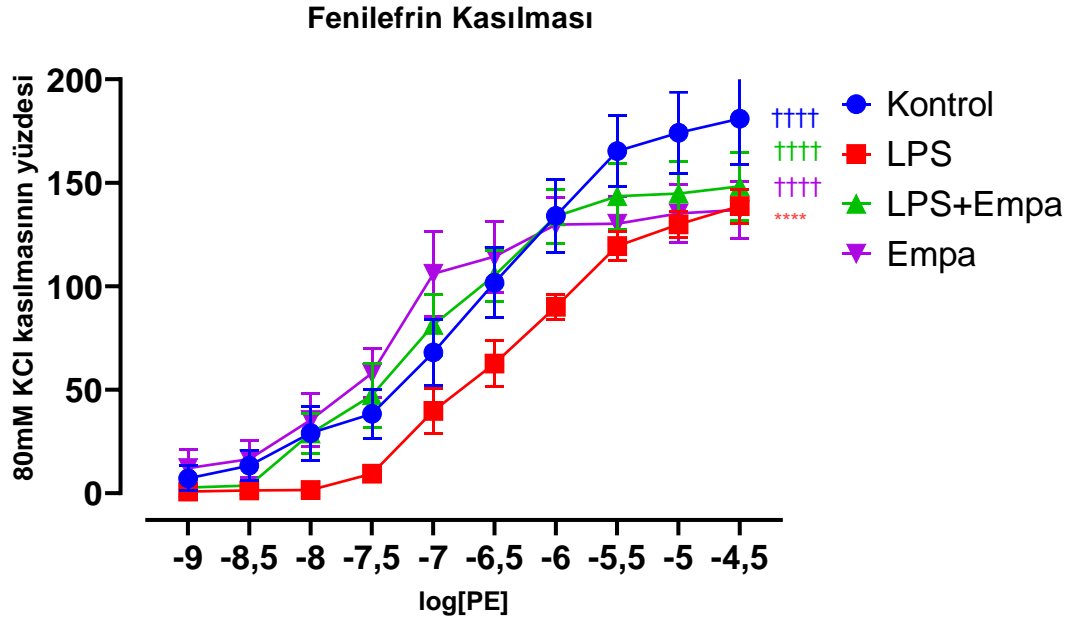
##### 4.2.2.2.1 80 mM KCl Kasılması



**Şekil 4.29.** Segmental arter 80 mM KCl yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=11-14).

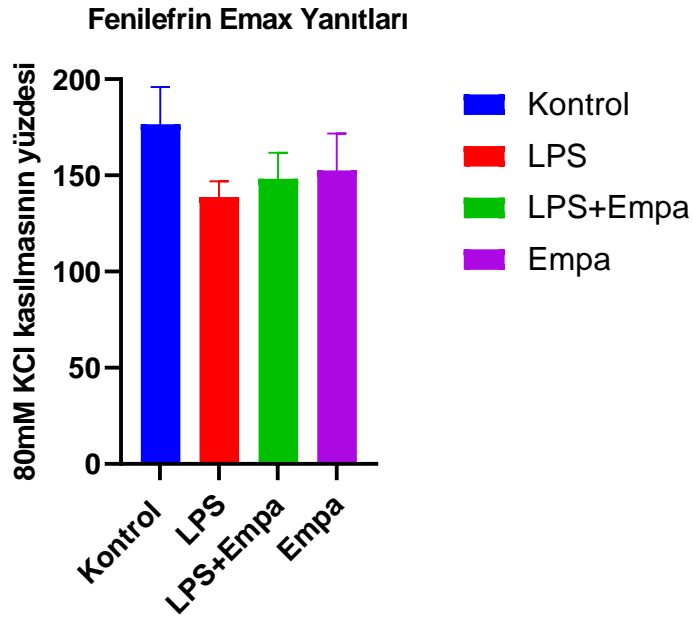
Miyografta segmental arter ile yapılan 80 mM KCl yanıtları değerlendirmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, (Kontrol: 1,405  $\pm$  0,3066-, LPS: 1,323  $\pm$  0,1701-, LPS+Empa: 1,417  $\pm$  0,2145-, Empa: 1,859  $\pm$  0,3605).

## 4.2.2.2.2. Fenilefrin Kasılması



**Şekil 4.30.** Segmental arter fenilefrin yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ††† $p < 0,0001$  (n=5-8).

Segmental arter fenilefrin yanıtları 80 mM KCl ile oranlanarak değerlendirildiğinde LPS grubunda fenilefrin yanıtlarının kontrol grubuna, LPS+Empa grubuna ve Empa grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Kontrol grubu ile LPS+Empa veya Empa grubu arasında anlamlı fark bulunmadı.

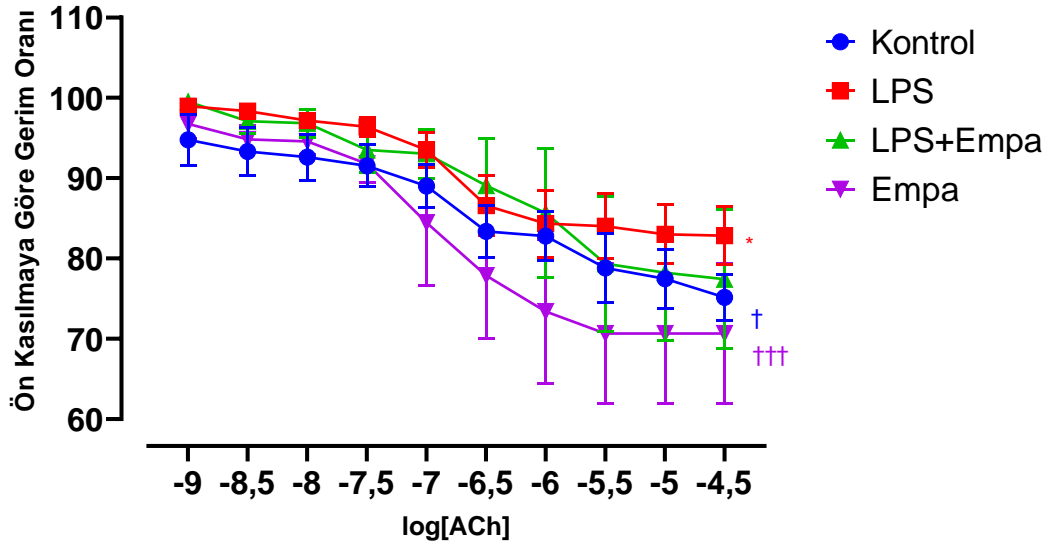


**Şekil 4.31.** Segmental arter fenilefrin Emax yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-8).

Segmental arter PE Emax yanıtlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol: 176,502  $\pm$  19,404-, LPS: 138,708  $\pm$  8,2-, LPS+Empa: 148,313  $\pm$  13,405-, Empa: 152,532  $\pm$  19,150).

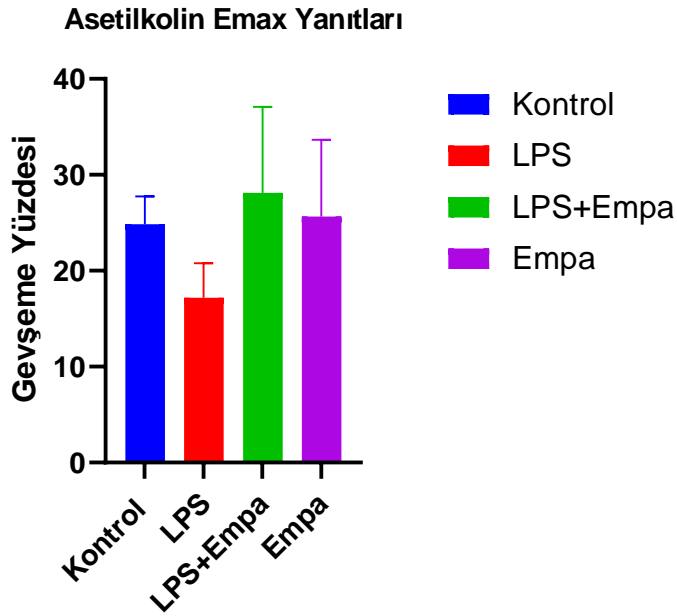
## 4.2.2.2.3. Asetilkolin Gevşemesi

## Asetilkolin Gevşemesi



**Şekil 4.32.** Segmental arter asetilkolin yanıtları. PE ön kasılması sonrası alındı. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , † $p < 0,0332$ , ††† $p < 0,0002$  (n=5-8).

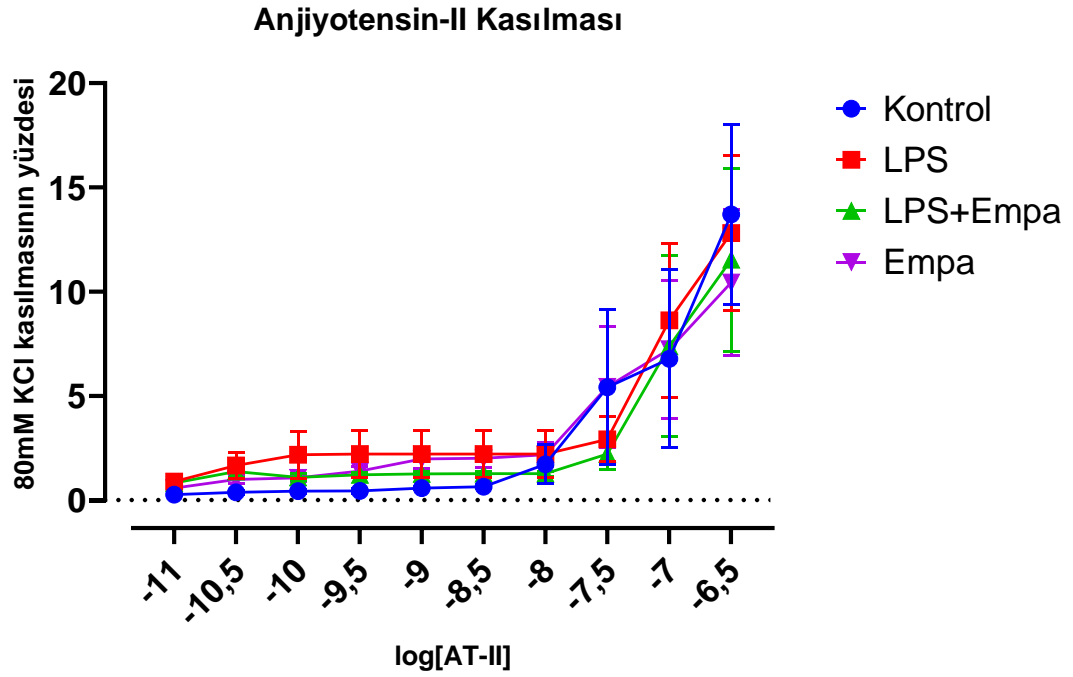
Segmental arterde PE ön kasılması sonrası alınan ACh gevşeme yanıtları değerlendirildiğinde LPS grubunda gevşeme yanıtlarının kontrol grubuna ve Empa grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü. LPS+Empa grubu ile kontrol grubu veya LPS grubu arasında bir fark bulunmadı.



**Şekil 4.33.** Segmental arter asetilkolin Emax yanıtları. Veriler aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-7).

Segmental arter ACh Emax yanıtlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol: 24,853 ± 2,912-, LPS: 17,175 ± 3,619-, LPS+Empa: 28,113 ± 8,965-, Empa: 25,663 ± 8,0).

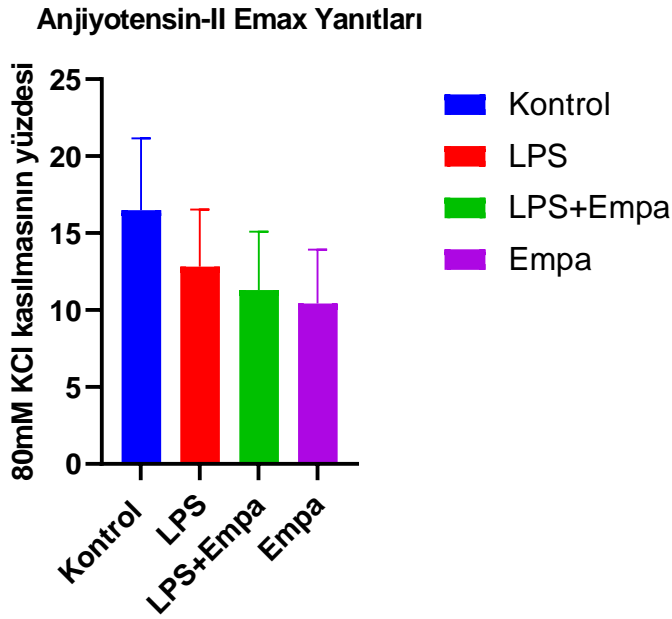
#### 4.2.2.2.4. Anjiyotensin-II Kasılması



**Şekil 4.34.** Segmental arter anjiyotensin-II yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA testi kullanıldı (n=5-8).

Segmental arterde alınan AT-II yanıtlarına bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

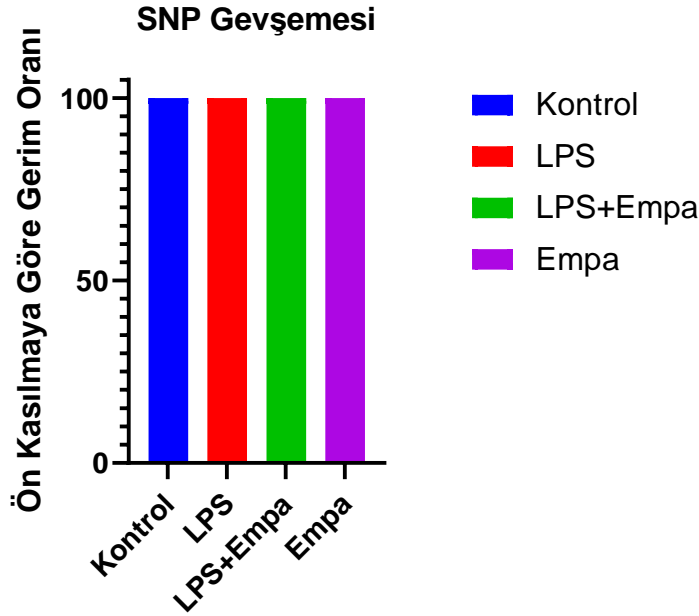




**Şekil 4.35.** Segmental arter anjiyotensin-II Emax yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-8).

Segmental arter AT-II Emax yanıtlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. (Kontrol:  $16,49 \pm 4,663$ -, LPS:  $12,812 \pm 3,72$ -, LPS+Empa:  $11,299 \pm 3,803$ -, Empa:  $10,437 \pm 3,491$ ).

#### 4.2.2.2.5. SNP Gevşemesi

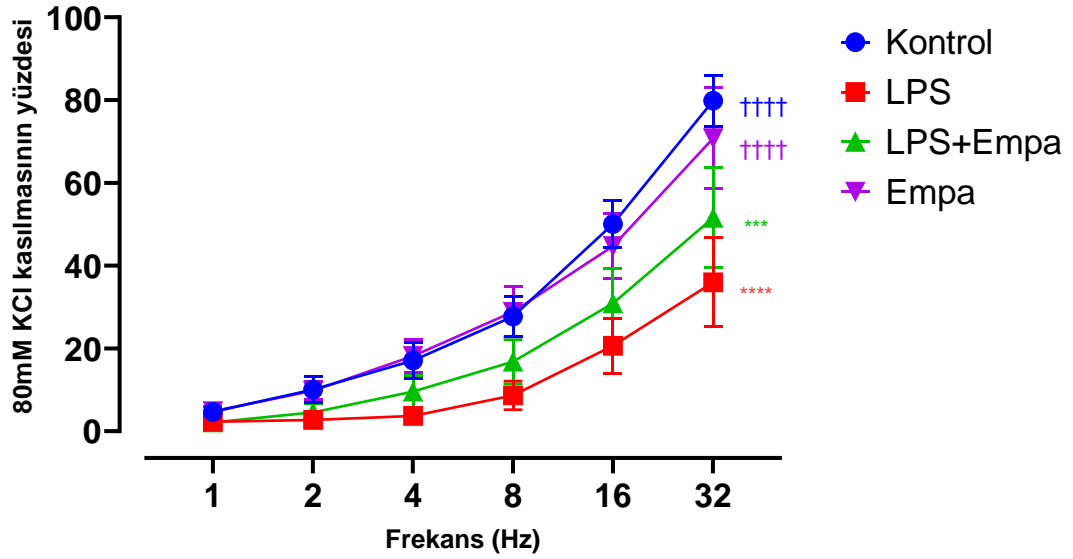


**Şekil 4.36.** Segmental arter SNP yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA testi kullanıldı (n=4-7).

Segmental arterde SNP yanıtları doku AT-II kasılması sonrası uzun süre stabil kalmadığı için  $10^{-4,5}$ M konsantrasyonda tek doz olarak alındı. Bu yanıtlar incelendiğinde gruplar arasında fark görülmedi. (Kontrol:  $100 \pm 0$ , LPS:  $100 \pm 0$ , LPS+Empa:  $100 \pm 0$ , Empa:  $100 \pm 0$ ).

#### 4.2.2.2.6. Elektriksel Alan Stimülasyonu

##### Elektriksel Alan Stimülasyonu

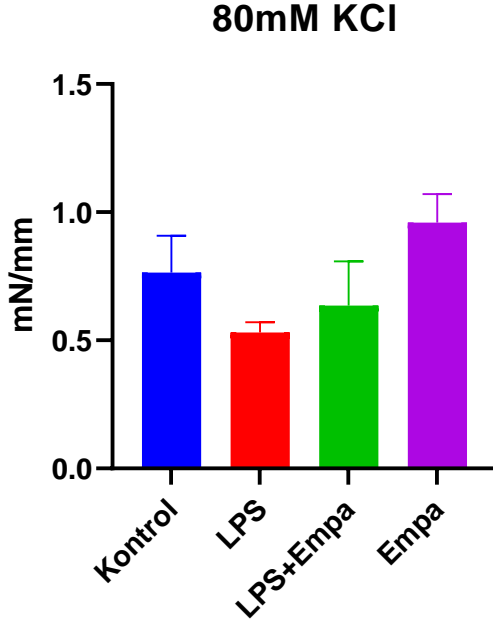


**Şekil 4.37.** Segmental arter elektriksel alan stimülasyonu yanıtları. EAS parametreleri 8 miliamper, 10 saniye toplam süre, 1 milisaniye uyarı süresi. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, + LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\* $p < 0,0002$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , +++ $p < 0,0001$  (n=6-8).

Segmental arterde 8 miliamper akım, 10 saniye toplam süre, 1 milisaniye tek bir uyarının süresi olacak şekilde elektriksel alan parametreleri ayarlanarak 1'den 32'ye kadar artan frekanslarda uyarılar oluşturuldu. Bu uyarılara dokunun verdiği kasılma yanıtları 80mM KCl kasılmasına oranlanarak incelendiğinde LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda kontrol grubuna göre EAS ilişkili kasılma yanıtlarının azaldığı görüldü, LPS grubundaki azalmanın Empa grubuna göre de anlamlı olduğu görüldü. LPS ve LPS+Empa grupları arasında fark bulunmadı.

### 4.2.2.3. Aort Sonuçları

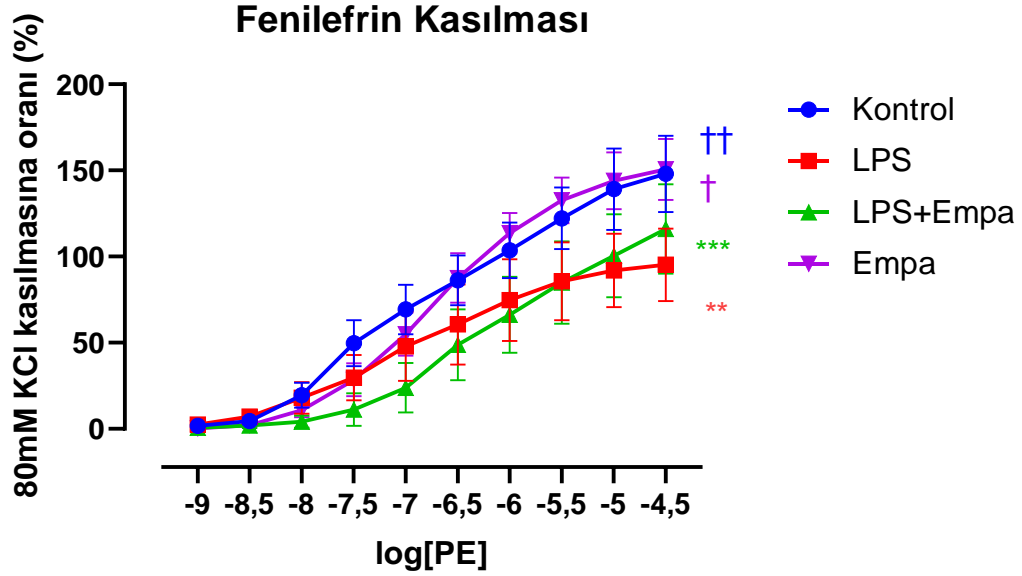
#### 4.2.2.3.1 80mM KCl Kasılması



**Şekil 4.38.** Aort 80mM KCl yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA testi kullanıldı (n=6-8).

Organ banyosunda aort ile yapılan 80mM KCl yanıtları incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. (Kontrol: 0,7639  $\pm$  0,1437-, LPS: 0,5308  $\pm$  0,0398-, LPS+Empa: 0,6350  $\pm$  0,1729-, Empa: 0,9597  $\pm$  0,1116).

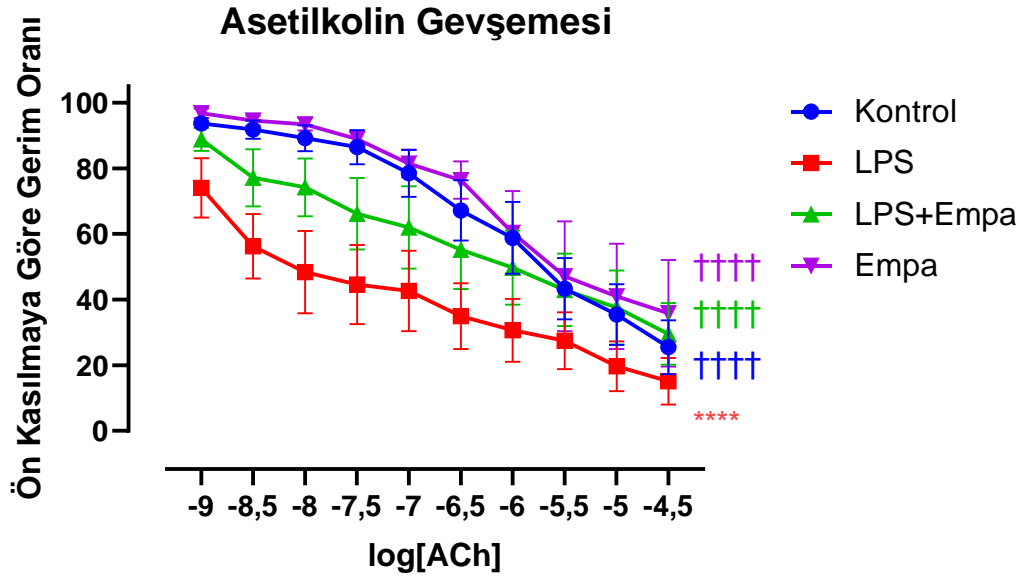
## 4.2.2.3.2. Fenilefrin Kasılması



**Şekil 4.39.** Aort fenilefrin yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\* $p < 0,0021$ , \*\*\* $p < 0,0002$ , † $p < 0,0332$ , †† $p < 0,0021$  (n=6-8).

Aort PE yanıtları incelendiğinde LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda fenilefrin kasılma yanıtlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı görüldü. LPS grubundaki azalmanın Empa grubuna göre de anlamlı olduğu tespit edildi. LPS ve LPS+Empa grupları arasında fark görülmedi.

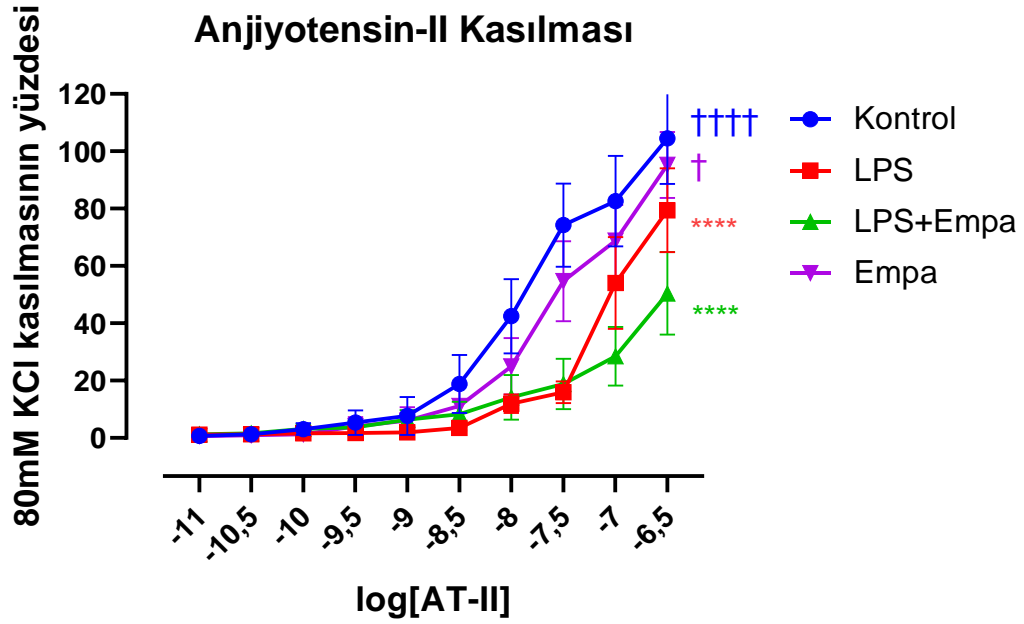
## 4.2.2.3.3. Asetilkolin Gevşemesi



**Şekil 4.40.** Aort asetilkolin yanıtları. Ön kasılma sonrası alındı. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrole göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , †††† $p < 0,0001$  (n=5-7).

Aort ACh yanıtları değerlendirildiğinde LPS grubunda PE ön kasılması sonrası ACh gevşemesinin kontrol grubu, LPS+Empa grubu ve Empa grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Kontrol grubu ile LPS+Empa veya Empa grupları arasında fark bulunmadı.

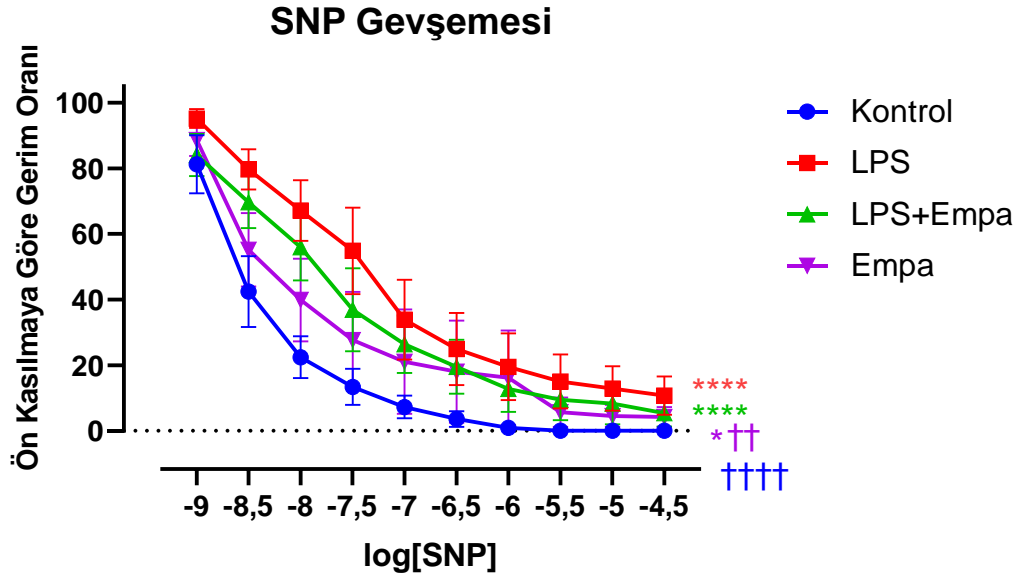
#### 4.2.2.3.4. Anjiyotensin-II Kasılması



**Şekil 4.41.** Aort anjiyotensin-II yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , † $p < 0,0332$ , †††† $p < 0,0001$  (n=6-7).

Aort AT-II yanıtları incelendiğinde LPS ve LPS+Empa grubunda AT-II yanıtlarının kontrol grubuna göre azaldığı, LPS grubundaki azalmanın Empa grubuna göre de anlamlı olduğu belirlendi. Kontrol ve Empa grupları arasında fark tespit edilmedi.

## 4.2.2.3.5. SNP Gevşemesi



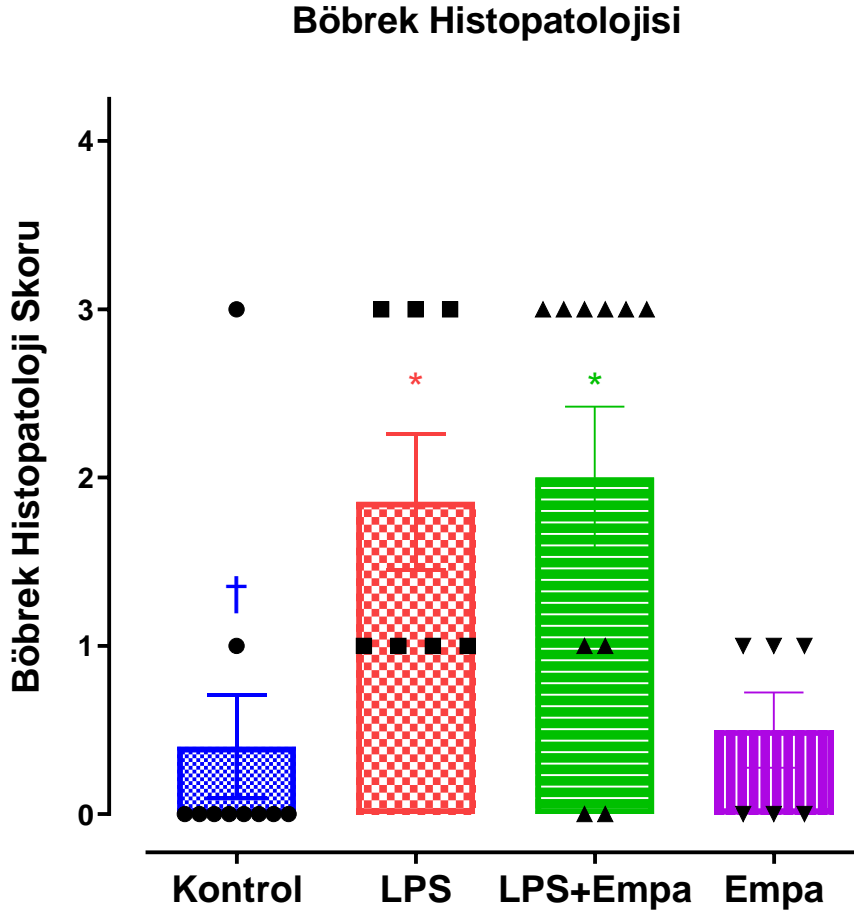
**Şekil 4.42.** Aort SNP yanıtları. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası şeklinde sunuldu. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Two-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , †† $p < 0,0021$ , †††† $p < 0,0001$  (n=6-7).

Aortta AT-II kasılması sonrası SNP yanıtları incelendiğinde LPS, LPS+Empa ve Empa grubunda kontrol grubuna göre SNP gevşeme yanıtlarının anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. LPS grubunda gevşeme yanıtlarının Empa grubuna göre de anlamlı düşük olduğu bulundu. LPS ve LPS+Empa grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.



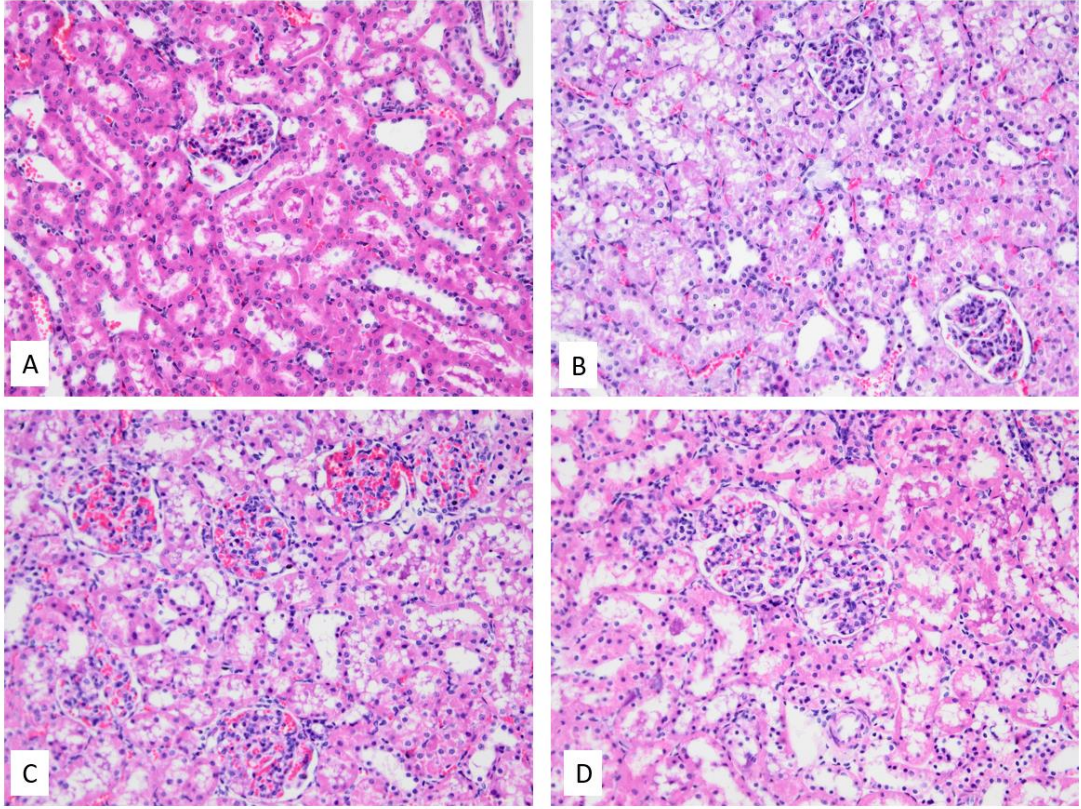
### 4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

#### 4.3.1. Böbrek Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları



**Şekil 4.43.** Sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde oluşan böbrek hasarına empagliflozinin etkisi. Böbrek hasarı semi-kantitatif olarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel inceleme için Kruskal-Wallis; çoklu karşılaştırmalar için Dunn post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \* $p < 0,0332$ , † $p < 0,0332$  ( $n = 6-10$ ).

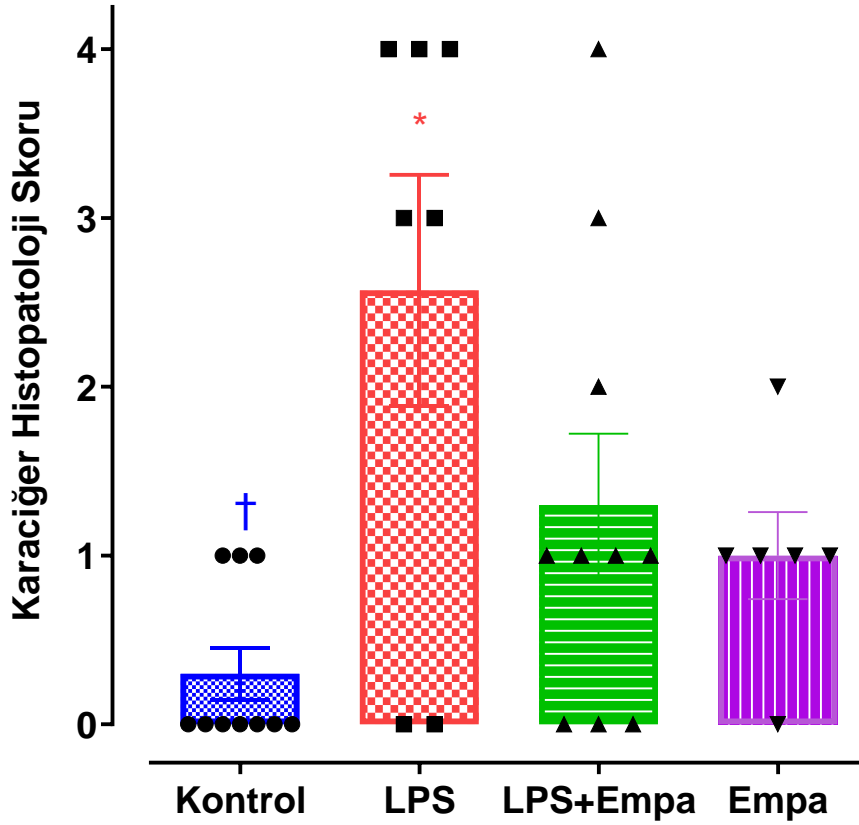
Işık mikroskopunda semi-kantitatif olarak değerlendirilen böbrek histopatolojik incelemesinde LPS ve LPS+Empa grubunda böbrekte hasarı gösteren histopatolojik skorun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi. Empa grubu kontrol veya LPS grubu ile fark göstermedi. Aritmetik ortalama ± ortalamanın standart hatası olacak şekilde gruplar; Kontrol:  $0,40 \pm 0,3055-$ , LPS:  $1,857 \pm 0,4041-$ , LPS+Empa:  $2,0 \pm 0,4216-$ , Empa:  $0,50 \pm 0,2236$ .



**Şekil 4.44.** Sıçanda sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde böbrekte oluşan hasarı ışık mikroskopunda gösteren mikrofotograflar. Normal böbrek histopatolojisi (A), şişmiş tübül epitel hücreleri (B), glomeruler konjesyon (C), tübüler nekroz (D).

## 4.3.2. Karaciğer Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

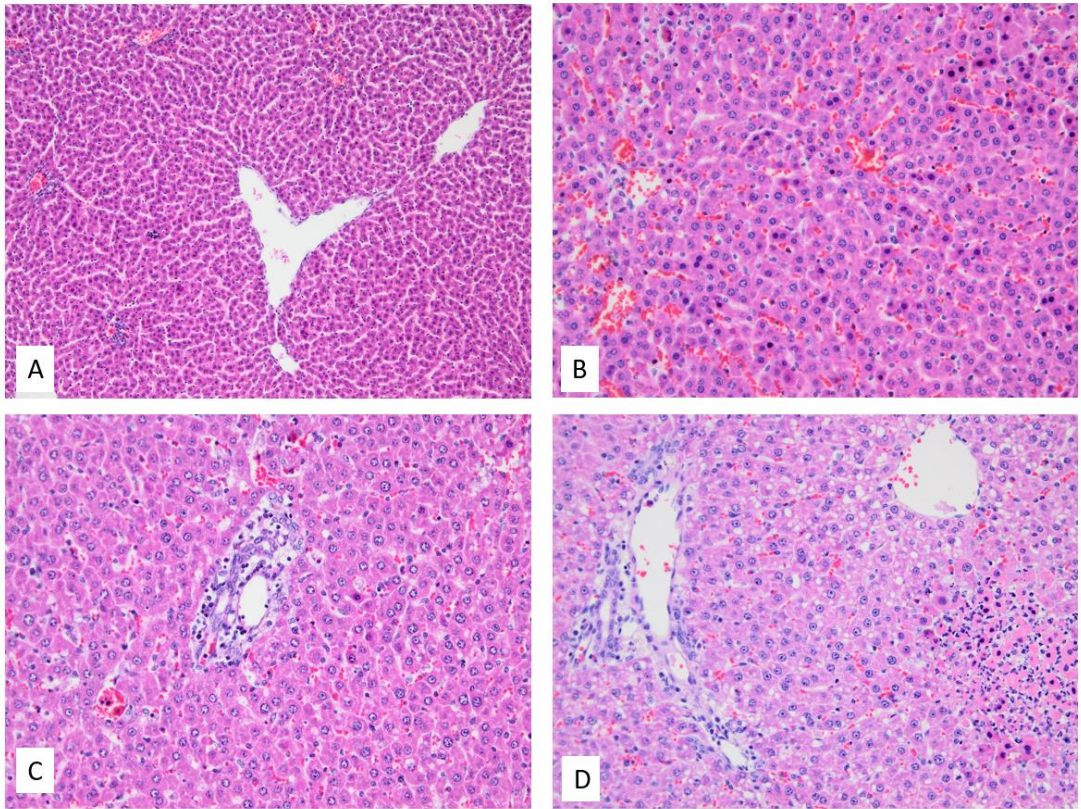
## Karaciğer Histopatolojisi



**Şekil 4.45.** Sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde oluşan karaciğer hasarına empagliflozinin etkisi. Karaciğer hasarı semi-kantitatif olarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. *Gruplar arası istatistiksel inceleme için Kruskal-Wallis; çoklu karşılaştırmalar için Dunn post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*p<0,0332, †p<0,0332 (n=6-10).*

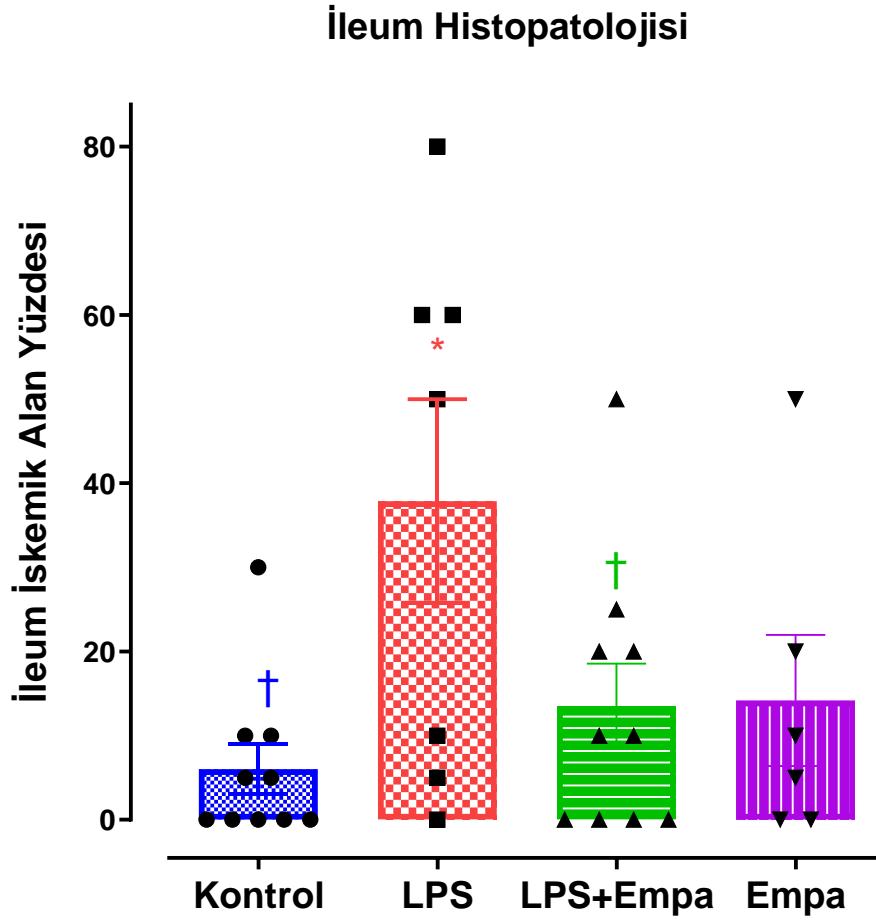
Işık mikroskopunda semi-kantitatif olarak değerlendirilen karaciğer histopatolojik incelemesinde LPS grubunda karaciğerde hasarı gösteren histopatolojik skorun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi. LPS +Empa ve Empa grupları kontrol veya LPS grubu ile fark göstermedi. Aritmetik ortalama±ortalamanın standart hatası olacak şekilde gruplar; Kontrol: 0,30 ± 0,1528-, LPS: 2,571 ± 0,6851-, LPS+Empa: 1,30 ± 0,4230-, Empa: 1,0 ± 0,2582.

Belirgin nekrobiyotik odak, nekroz ve belirgin inflamatuvar hücre infiltrasyonu (histopatolojik skor 3-4) içeren örneklerin varlığı için değerlendirme yapıldığında ise kontrol ve Empa gruplarında yüksek histopatolojik skor içeren örnek bulunmazken (%0), LPS grubunda bu oranın %71,4 olduğu LPS+Empa grubunun da bu oranın %20'ye düştüğü görüldü.



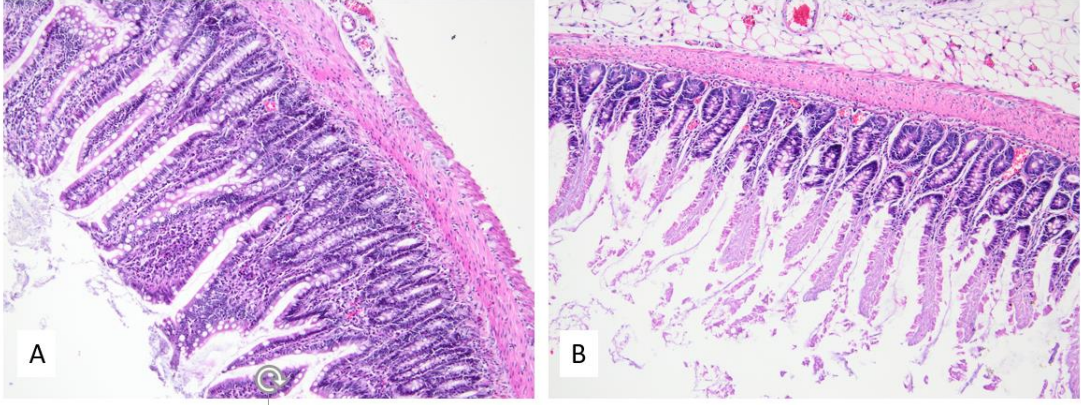
**Şekil 4.46.** Sıçanda sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde karaciğerde oluşan hasarı ışık mikroskopunda gösteren mikrofotograflar. Normal karaciğer histopatolojisi (A), şişmiş hepatositler, dilate sinüsler (B), Portal inflamasyon (C), Nekrobiyotik odak (D).

### 4.3.3. İleum Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları



**Şekil 4.47.** Sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde oluşan ileum hasarına empagliflozinin etkisi. İleum hasarı semi-kantitatif olarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. *Gruplar arası istatistiksel inceleme için One-way ANOVA; çoklu karşılaştırmalar için Dunnett post-hoc testleri kullanıldı. \* Kontrolle göre anlamlılık, † LPS'ye göre anlamlılık. \*p<0,0332, †p<0,0332 (n=6-10).*

Işık mikroskopunda semi-kantitatif olarak değerlendirilen ileum histopatolojik incelemesinde LPS grubunda ileumda hasarı gösteren histopatolojik skorun kontrol grubuna ve LPS + Empa grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi. Empa grubu kontrol veya LPS grubu ile fark göstermedi. Kontrol grubu ile LPS+Empa grubu da fark göstermedi. Aritmetik ortalama±ortalamanın standart hatası olacak şekilde gruplar; Kontrol: 6,0 ± 2,963-, LPS: 37,86 ± 12,14-, LPS+Empa: 13,50 ± 5,058-, Empa: 14,17 ± 7,791.



**Şekil 4.48.** Sıçanda sepsis ilişkili akut böbrek hasarı deneysel hayvan modelinde ileumda oluşan hasarı ışık mikroskopunda gösteren mikrofotografılar. Normal ileum histopatolojisi (A), yaygın iskemik değişiklikler (B).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada sepsis ilişkili akut böbrek hasarı modelinde SGLT-2 inhibitörü olan empagliflozinin renal ve sistemik fizyolojik fonksiyonlara etkisi incelendi. Bu çalışma LPS ile indüklenen sıçan sepsis modelinde empagliflozin tedavisinin, akut böbrek hasarı ile birlikte böbrek damar yatağı, renal arter dalları ve aort fonksiyonel cevapları üzerine etkilerinin karşılaştırılarak değerlendirildiği ilk çalışma olmuştur. Bu çalışmada yine güncel literatür bilgileri doğrultusunda ilk kez sıçanda sepsis ilişkili akut böbrek hasarında üreter perfüzyon çıkışı ölçümü ve renal arter dallarında EAS yanıtı değerlendirilmiştir.

### **5.1. Empagliflozin idrar glikoz atılımını artırdı, kan glikozunu değiştirmedir. Empagliflozin tedavisi LPS ile atılımı artan idrar lökosit miktarını azalttı.**

Empagliflozinin fizyolojik fonksiyonlara olan etkisini değerlendirmek için yapılan ölçümlerden olan kan glikozu ölçümünde kan glikozu düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında LPS grubunda ve LPS+Empa grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde LPS modellerinde gözlenen glikoz azalması ile bu çalışmada elde edilen bulguların uyumlu olduğu görülmüştür (71, 72). Bununla birlikte empagliflozinin kan glikoz düzeylerinde ilave bir azalma yapmaması ise empagliflozinin kan glikozunu düşürücü etkisinin esas olarak tip 2 DM'li hastalarda görülmesiyle açıklanabilir (73, 74).

Alınan idrar örneklerinde incelenen idrar glikozu ölçümlerinde kontrol ve LPS gruplarında hiç glikoz tespit edilmezken Empa ve LPS+Empa gruplarında idrarda glikoz tespit edildi. Literatürde de belirtildiği üzere empagliflozin bir SGLT-2 inhibitörü olarak alındıktan sonra kısa sürede idrarda glikoz atımına yol açar. Empa verilen gruplarda idrarda glikoz atımının tespit edilmesi ilacın veriliş yolu ile birlikte verilen dozda ve sürede sıçanda etkili olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

İdrarda lökosit ölçümlerinde ise LPS grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak idrarda lökosit varlığının arttığı tespit edildi. İdrar lökosit ölçümlerinde LPS grubunda görülen artış sepsis ilişkili akut böbrek hasarında gözlenen bir durum olup, bu çalışmada kullanılan modelin tetiklediği akut böbrek hasarını teyit etmesi

açısından önemlidir. LPS + Empa grubu ise LPS grubunda görülen lökosit artışını geri döndürmüştür. Bu durum empagliflozin tedavisinin LPS ile oluşan hasarı geri döndürmede düzeltici etkisi olduğunu göstermektedir.

Deney hayvanları ile yapılan sepsis modellerinde kilo kaybının olması beklenir (75, 76). Bundan dolayı LPS ve ilacın verildiği an ile uygulamaların yapıldığı zaman arasındaki ağırlık kaybı ölçümlerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir, ağırlık kaybı ölçümleri değerlendirmenin daha doğru yapılabilmesi amacıyla ağırlık kaybı hayvanın 0. saat ağırlığına oranlanarak ifade edilmiştir. Fark olmamasının sebebi ilacın tek doz verilmesi, deney süresinin kısalığı, deney hayvanının türü, cinsi, soyu, hayvanların barındığı ortam koşulları ile ilgili olabilir. Deney protokolünde tüm hayvanların enjeksiyonlardan sonra aç bırakılması da fark gözlenmesini engellemiş olabilir.

## **5.2. Empagliflozin tedavisi böbrek, karaciğer ve ileumda LPS ile azalan kan akımını geri döndürmedi.**

LPS ile indüklenen sepsis modellerinde kan akımı ölçümü değerlendirmeleri incelendiğinde zamana bağlı olarak kan akımı hızlarının değiştiği gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda incelenen renal arter, mezenter arter ve portal ven kan akımı ölçümlerinde LPS verilen gruplarda kan akımlarında azalma tespit edilirken empagliflozin tedavisi her üç damarda da bu azalmaya etkili olmamıştır. Kan akımları hayvan ağırlığına oranlanarak değerlendirildiğinde de kan akımı ölçümü yapılan tüm damarlarda sonuçlar aynı elde edilmiştir.

Böbrek perfüzyonundan sorumlu olan renal arter kan akımı ile sepsis arasındaki ilişki pek çok çalışmada değerlendirilmiş olup alınan ölçümler, hayvanın cinsi, ölçümün anestezisi altında olup olmaması, verilen anestezi madde, ölçümün nasıl yapıldığı, ölçümün sepsis modelinden ne kadar süre sonra yapıldığı, hayvanın sepsisin hiperdinamik fazında mı hipodinamik fazında mı olduğu, kullanılan sepsis modeli, hayvana sıvı desteğinin varlığı veya yokluğu gibi pek çok farklı değişkene bağlı olarak değişebilir (44). Bu çalışmada uygulanan modelde sepsis ilişkili akut böbrek hasarı oluşması için LPS verilmesinden 19 saat sonra hayvanlara anestezisi verilmiş 19,5



saat sonra ise kan akımı ölçümleri yapılmıştır. Renal arter kan akımı ölçümü renal arter üzerinden prob ile doğrudan ölçülmüş, hayvana tüm deney süreci boyunca hiçbir aşamada sıvı desteği uygulanmamıştır.

Bu çalışmada renal arter kan akımının sepsis modelinde azaldığı gösterilmiş olup ölçülen renal arter kan akımı değerleri literatürdeki diğer çalışmalarda ölçülen değerler ile benzer bulunmuştur(77). Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde çalışmaların çoğunluğunda sepsisin renal kan akımında azalmaya neden olduğu ifade edilmektedir(44, 78). Ancak bununla birlikte kan akımında değişiklik olmayan veya artma olan çalışmalar da mevcuttur (79, 80). Bu durum sepsiste ölçüm sırasında hayvanın hiperdinamik veya hipodinamik fazda olmasıyla açıklanabilir. Bu çalışmada ölçümlerde superior mezenter arter ve portal ven kan akımı ölçümlerinde de kan akımında azalma olması, ölçümlerin LPS verilmesinden 19,5 saat sonra başlaması literatür ile uyumlu olarak hayvanın sepsiste hipodinamik fazda olduğunu işaret etmektedir (43, 81-83).

Karaciğer perfüzyonunda önemli rolü olan portal ven kan akımının sepsis modelinde kontrole göre azaldığı gösterilmiş olup literatürde sepsiste portal kan akımı üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde portal kan akımının sepsiste azaldığı çalışmalar görülebilir (81, 84, 85). Ancak aynı renal arterde olduğu gibi akımın azalmayıp arttığı çalışmalar da mevcuttur (86). Bu paradoksik durum ölçümlerin sepsisin hiperdinamik veya hipodinamik fazında olup olmaması ile açıklanabilir (87).

Barsakların perfüzyonunda rol oynayan superior mezenter arter kan akımı da akım ölçümü yapılan diğer damarlar gibi sepsis modelinde anlamlı şekilde azalmıştır. Literatürde sepsiste kan akımının hipodinamik fazda düştüğü ve sıvı tedavisi ile hiperdinamik faza geçişin sağlanıp kan akımının arttığı çalışmalar mevcuttur (88, 89). Superior mezenter arter için de kan akımının değişmediğini iddia eden bir çalışma literatürde mevcuttur (90).

Bu tez çalışmasında damarlardaki kan akım hızı ölçümlerinde tespit edilen ortak sonuç LPS+Empa grubunda empagliflozin tedavisinin kan akım hızlarında LPS verilmesiyle görülen azalmayı önlememesidir. Literatürde empagliflozinin

damarlarda kan akımı üzerine olan etkilerini araştıran çalışmalar incelendiğinde tip 2 DM'li sıçanda miyokard infarktüsü modelinde kronik empagliflozin tedavisinin koroner kan akımını artırdığı belirtilmiştir (91). Yapılan başka bir çalışmada da sıçanlarda iki ayrı model ile oluşturulan tip 1 ve tip 2 DM modellerinde kronik empagliflozin tedavisinin renal kan akımını değiştirmedeği ifade edilmiştir (92). Bir insan çalışmasında ise kronik (8 hafta) empagliflozin tedavisinin tip 1 DM'li hastalarda artmış olan renal kan akımını azalttığı gösterilmiştir (93). Bu çalışmada empagliflozinin bu etkisinden afferent arteriyollerde gelişen vazokonstriksiyonun sorumlu olabileceği öne sürülmüştür, tübüllerde SGLT-2 inhibisyonunun tbloglomeruler geri besleme sistemini etkileyerek afferent arteriyollerde tonüsü düzenlediği iddia edilmiştir. İnsanlarda yapılan bir başka çalışmada da tip 2 DM'li hastalara tek doz empagliflozin verilmesinin GFR'yi ve natriüresi artırdığı da gösterilmiştir (52).

Bu tez çalışmasında seçilen modelde, akut gelişen ve ölümcül olabilen bir durum söz konusudur, tedavi için kronik (uzun süreli) tedavilerin değil akut tedavilerin verilmesi gerekmektedir. Yine bu çalışmanın amaçlarından biri olan damar fonksiyonlarının değerlendirilmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada LPS verilmiş farelerde tek doz empagliflozin tedavisinin bozulan torasik aort yanıtlarında düzeltici yönde etkili olduğu tespit edilmiştir (54). Farelere 3 gün empagliflozin n tedavisi verilmesinin sepsis tedavisinde etkili olabileceği de gösterilmiştir (57). rnek verilen bu literatür bilgileri ile sepsis ve sepsis ilişkili akut böbrek hasarı tedavisinin oluşum süreci, ilerleme hızı dikkate alınarak bu tez çalışmasının protokolü oluşturulmuştur. Kan akımlarında düzelme olmamasının sebebi empagliflozinin renal arter, superior mezenter arter ve portal ven kan akımına etkisinin olmaması olabilir. Empagliflozinin kan akımı üzerine etkisinin gösterildiği çalışmalarda daha uzun süreli verilmesi de bu çalışmada empagliflozinin kan akımlarına etki göstermemesini açıklayabilir. Empagliflozin tedavisinin daha uzun süreli (kronik tedavi) veya farklı yoldan verilmesi veya sepsisin daha erken aşamalarında hiperdinamik fazda verilmesi de etki oluşturabilir.

### **5.3. İzole perfüze böbrek düzeneğinde sepsis ilişkili akut böbrek hasarında üreter perfüzet çıkışı azaldı, empagliflozin tedavisinin olumlu etkileri gözlemlendi.**

İzole perfüze böbrek düzeneğinde kullanılan böbreklerin ağırlığı hayvan ağırlığına oranlanarak değerlendirildiğinde LPS grubunda böbrek/hayvan ağırlığı oranı yüksek olup bu durum sepsis ilişkili akut böbrek hasarında oluşabilecek ödem ile açıklanabilir de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Böbrek/hayvan ağırlığı oranı değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

İzole perfüze böbrekte sabit perfüzyon altında üreter perfüzet çıkışı sonuçları incelendiğinde LPS grubunda üreter perfüzet çıkışının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Bu durum klinikte görülen akut böbrek hasarı ilişkili idrar çıkışı azalması ile uyumlu olup çalışmada kullanılan model ile oluşan hasarı doğrulaması açısından önemlidir. Empagliflozin tedavisinde ise bu azalma ortadan kalkmış olduğundan empagliflozin tedavisinin bozulan böbrek fonksiyonu ile ilgili başarılı olduğu şeklinde yorumlanabilir. İdrar lökosit ölçümlerinde empagliflozin tedavisi ile görülen düzelme ile birlikte değerlendirildiğinde empagliflozinin sepsiste görülen böbrek fonksiyonel ve yapısal hasarına karşı faydalı olabileceği düşünülebilir.

Empagliflozinin antiinflamatuvar etkinliği güncel bir araştırma konusu olup empagliflozinin kalp karaciğer ve böbrekte antiinflamatuvar etkinliğini gösteren yayınlar mevcuttur. Farelerde diyabetik nefropati modelinde empagliflozin tedavisinin etkilerini inceleyen bir çalışmada empagliflozin tedavisinin IL-6, MCP-1, Rantes gibi proinflamatuvar işaretçileri baskılayabildiği gösterilmiştir (94). Başka bir çalışmada empagliflozinin karaciğer ve böbrekte kaspaz-1 ve IL-1 $\beta$  düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir (95). Diğer bir yayında da kalp yetmezliği modelinde empagliflozinin kalpte antiinflamatuvar etkinliği de belirtilmiştir (55). Farelerde sepsis ilişkili akut böbrek hasarı modelinin incelendiği başka bir çalışmada empagliflozinin hem renal hem sistemik inflamasyon üzerine azaltıcı etki gösterebildiği ifade edilmiştir. Böbrekte TNF- $\alpha$ , IL-6, kaspaz-1 gibi inflamatuvar işaretçilerin empagliflozin tedavisinde ekspresyonunun azaldığı, plazmada da özellikle TNF-  $\alpha$ , IL-16, IL-17 ve

INF $\gamma$  düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (57). Aynı çalışmada empagliflozin tedavisinin antifibrotik etkisi ile mortalite üzerine de olumlu etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca empagliflozinin kalpte inflamasyonu AMP kinaz (AMPK) yolağı üzerinden azalttığı gösterilmiştir (54). Aynı çalışmada LPS verilmesiyle artan kan TNF- $\alpha$  düzeylerinin empagliflozin tedavisi ile azaldığı, kalpte artan iNOS düzeylerinin tedavi ile azaldığı, kalpte azalan ATP/ADP oranının tedavi ile arttığı tespit edilmiştir. Ek olarak çalışmanın kardiyomiyositler üzerindeki kısmında LPS ile artan TNF- $\alpha$  ve nitrit düzeylerinin empagliflozin tedavisi ile azaldığı, AMPK inhibitörlerinin bu etkiyi azaltırken, AMPK aktivatörlerinin ise belirginleştirdiği belirtilmiştir. Empagliflozinin idrar lökosit miktarı ve üreter perfüze çıkışı ölçümlerindeki düzeltici etkisi bahsedilen inflamatuvar yollar üzerine olan antiinflamatuvar etkisinden dolayı olabilir.

İzole perfüze böbrek düzeneğinde yapılan ölçümlerde bazal perfüzyon basıncı düzeylerinde LPS grubunda kontrole göre fark tespit edilmemiştir. LPS+Empa grubunda ise kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü. Kontrol grubunda elde edilen değerler literatürdeki bazal basınç değerleri ile uyumludur (96, 97). LPS grubu ve Empa grubu ile kontrol grubu arasında fark görülmezken LPS+Empa grubunun, kontrol grubuna göre bazal perfüzyon basıncının anlamlı şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. LPS grubu ile LPS+Empa grubu arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde sıçanda perfüzyon sıvısına *Escherichia coli* eklenmesi ile oluşturulan akut böbrek hasarı modelinde basınç sabit tutularak yapılan izole perfüze böbrek deneylerinde perfüze akım hızının azaldığı ve renal vasküler direncin arttığı bulunmuştur (98). Farelerde yapılan ayrı bir çalışmada da LPS verilerek oluşturulan akut böbrek hasarı modelinde sabit basınç altında akımın azaldığı ve direncin arttığı gösterilmiştir (99).

LPS+EMPA grubunda görülen basınç azalmasının sebebi ise renal vasküler direnç azalması olarak değerlendirilebilir. Renal vasküler direnç artışı sepsis ilişkili akut böbrek hasarı patogeneğinde son derece önemlidir, sepsiste renal mikrovasküler dolaşımda meydana gelebilecek mikrotromboz, ödem, endotel disfonksiyonu, vazokonstriksiyon gibi olaylar renal vasküler direnç artışı yapabilir. LPS grubunda kontrole göre olması beklenen direnç ve basınç artışı tespit edilmemiştir. Bunun

sebebi kullanılan deney hayvanının soyu, deney koşulları ile açıklanabilir. LPS ile birlikte empagliflozin verilmesi ise yukarıda bahsedilen mekanizmalara etki göstererek renal vasküler direnci azaltmış olabilir.

**5.4. Renal arter dallarında ve aortta sepsiste fenilefrin kasılma yanıtları azaldı, empagliflozin tedavisi renal arter dallarında bu azalmayı düzeltti. İzole perfüze böbrek düzeneğinde kasılma yanıtları değişmedi.**

Miyograf ve organ banyosu kısımlarında incelenen renal arter ikinci dalı, segmental arter ve aortta da dokulara protokol başlangıcında 80mM KCl verildi. Böylelikle hem doku bütünlüğünün değerlendirilmesi hem de kasıcı ajanların değerlendirmesinin 80mM KCl ile oranlanarak daha doğru yapılabilmesi hedeflendi. 80mM KCl yanıtlarında damarlarda gruplar arasında fark gözlenmedi.

İzole böbrek perfüzyon düzeneğinde kasılma cevaplarında (norepinefrin, anjiyotensin-II ve fenilefrin) gruplar arasında fark olmazken aortta fenilefrin ve AT-II cevaplarının LPS grubunda kontrol grubuna göre azaldığı, LPS+Empa grubunda ise bu azalmanın geri dönmediği görüldü. Miyograf deneylerinde renal arterin ikinci dalında fenilefrin cevaplarının kontrole göre LPS, LPS+Empa ve Empa grubunda azaldığı, LPS+Empa grubunda LPS grubuna göre de fenilefrin cevaplarında anlamlı bir düzelme olduğu görüldü. Renal arter ikinci dalı AT-II yanıtlarına bakıldığında LPS ile yanıtlarda artış gözlenirken LPS+Empa grubunda bu artışın geri döndüğü tespit edildi. Segmental arter PE yanıtlarında LPS grubunda azalma görülürken bu azalmanın LPS+Empa grubunda geri düzeldiği görüldü, AT-II yanıtlarında segmental arterde fark görülmedi. Kasılma yanıtları incelendiğinde LPS modelinde aortta görülen PE yanıtlarındaki azalma literatürde daha önce gösterilmiştir (100-102). 2009 yılında yapılan bir yayında sepsis modelinin indüklenmesinden sonra zaman içinde fenilefrin yanıtlarının giderek azaldığı gösterilmiş olup 12.saatten sonra PE kasılma yanıtlarının belirgin düşmesi sepsisteki fazların farmakolojik ajanlara karşı dokunun yanıtını nasıl etkilediğini göstermek açısından son derece önemlidir (103). Bu çalışmadaki veriler ile bizim çalışmamızda elde edilen veriler PE veriliş zamanı ve görülen etki açısından birbiri ile uyumludur. Fenilefrin dışında norepinefrin ile alınan yanıtlarda da LPS

modelinde azalma olduğu ortaya konmuştur (104-106). Bu durumun  $\alpha_1$  adrenerjik reseptör mRNA ve protein ekspresyonunda azalma, hücre içi ikincil haberci düzeylerinde azalma, ortam  $Ca^{+2}$  düzeyleri ile ilişkisi olabileceği öne sürülmüştür (106-108). Bu çalışmalardan birinde G proteini kenetli reseptörlerin modülasyonunda rol oynayan G protein reseptör kinaz-2'nin (GRK-2) ekspresyonunun sepsiste azaldığı, GRK-2 inhibisyonu ile NE cevaplarında görülen azalmanın geri döndüğü gösterilmiştir (106). Miyograf deneylerinde damarlarda LPS grubunda görülen PE yanıtlarındaki azalma aorttaki azalmayla uyumlu olup aortun aksine segmental arterlerde empagliflozin tedavisi azalmayı geri döndürmüştür renal arter ikinci dalında da kısmi düzelme sağlamıştır. Empagliflozin tedavisi bu iyileşmeyi yukarıda bahsedilen  $\alpha_1$  adrenerjik reseptör mRNA ve protein ekspresyonunda azalma, hücre içi ikincil haberci düzeylerinde azalma,  $Ca^{+2}$  düzeylerini etkileme, GRK-2 ile etkileşme gibi mekanizmalar üzerinden yapmış olabilir. Bu çalışmada izole böbrek perfüzyon düzeneğinde kasılma cevaplarında (norepinefrin, anjiyotensin-II ve fenilefrin) gruplar arasında fark olmamıştır. Literatüre bakıldığında tavşanlarda yapılan bir çalışmada septik şok modelinde izole perfüze böbrek düzeneğinde NE yanıtlarının değişmediği gösterilmiştir (109). İzole perfüze böbrek düzeneğinde kasılma yanıtlarında fark bulunmamasının sebebi böbrek damar yatağındaki düzeltici nöronal veya diğer mekanizmalar olabilir, miyograf ve organ banyosunda tek bir damar incelenirken izole perfüze böbrek düzeneğinde tüm böbrek damar yatağı incelenmiştir.

**5.5. Sepsiste aortta anjiyotensin-II kasılma yanıtları azalırken renal arter ikinci dalında anjiyotensin-II kasılma yanıtları arttı, empagliflozin tedavisi renal arter ikinci dalında bu artışı düzeltti.**

AT-II kasılma yanıtlarına bakıldığında aortta AT-II kasılma yanıtlarının sepsiste azaldığı görüldü. Literatüre bakıldığında sıçanlarda sepsis modelinde ortalama arter basıncında (OAB) AT-II ile görülen artışın azaldığı görülmüştür. Diğer bir çalışmada da LPS infüzyonu yapılan sıçanda Doppler probu ile yapılan ölçümlerde AT-II ile OAB'de görülen artışın sepsiste azaldığı görülmesine rağmen böbrekte AT-II yanıtlarının arttığı tespit edilmiştir (110). Ek olarak bu çalışmada izole perfüze mezenter damar yatağında yapılan deneyde ise AT-II yanıtlarının değişmediği gösterilmiştir.

Bahsedilen çalışmada elde edilen bulgular bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile uyumaktadır, sistemik AT-II kasılma yanıtının azalmasına rağmen böbrekte aksine arttığı burada da tespit edilmiştir. Perfüzyon deneyleri de mezenter damar yatağında yapılmış olmasına karşın bu çalışmadaki böbrek damar yatağında elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur. Sıçanlarda i.v *Escherichia coli* infüzyonu ile oluşturulan endotoksemi modelinde, aort AT-II kasıcı yanıtlarının azalırken bölgesel dolaşım için videomikroskopi ile değerlendirilen kremaster kası AT-II kasıcı yanıtlarının arttığı gözlenmiştir. Başka bir çalışmada tavşanlarda izole perfüze böbrek düzeneğinde NE yanıtları değişmezken kulak merkez arterinde NE yanıtlarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sistemik vazokonstriktör yanıt ile bölgesel vazokonstriktör yanıtlar arasında fark olabileceğini göstermesi açısından önemlidir (109, 111). Sistemik vazokonstriktör yanıt ile bölgesel vazokonstriktör yanıt arasında farklılık olabilmesi vücudun daha öncelikli olan (vital) dokulara kanı yönlendirebilmesiyle açıklanabilir.

Başka bir çalışmada da sıçanlarda sepsis modelinde anjiyotensin-II düzeylerinin artmasına rağmen AT-II tip 1 reseptörlerin ekspresyonunun azaldığı, i.v. AT-II verildiğinde OAB'de görülen artışın sepsis modelinde azaldığı tespit edilmiştir (112). Yine aynı çalışmada proinflamatuvar sitokinler IL-1B, TNF-  $\alpha$ , interferon- $\gamma$ 'nın ve NO'nun sinerjistik olarak AT-II reseptör ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir.

#### **5.6. Renal arter dallarında ve izole perfüze böbrekte sepsiste asetilkolin gevşeme yanıtları azalırken aortta arttı, empagliflozin bu değişikliklere düzeltici etki gösterdi.**

Sepsiste ACh gevşeme yanıtları renal arter dallarında ve izole perfüze böbrek düzeneğinde azalırken empagliflozin tedavisinin renal arter ikinci dalı ve izole perfüze böbrekte düzeltici etkisi tespit edildi. Renal arter ikinci dalında ACh Emax yanıtı LPS ve LPS+Empa gruplarında kontrole göre azalırken segmental arterde Emax yanıtları gruplar arasında değişmedi. Aortta ise sepsiste ACh gevşeme yanıtları artarken empagliflozin tedavisi bu artışı geri döndürdü. Aortta sepsiste görülen gevşeme yanıtındaki artış literatür ile uyumludur (113). Literatürde gevşeme yanıtlarının azaldığı veya değişmediği çalışmalar da bulunmakla birlikte bu çalışmalar sepsisin

muhtemelen hiperdinamik fazında yapılmıştır (54, 114). ACh gevşemeleri incelendiğinde etkinin NO, PGI<sub>2</sub> ve EDHF üzerinden olabildiği tespit edilmiştir. NO sentezinde rol oynayan ve sırasıyla Nitrik Oksit Sentaz-1 (NOS-1, nNOS), NOS-2 (iNOS), ve NOS-3 (eNOS) olarak isimlendirilen 3 farklı NOS enzimi mevcuttur. NOS-2 sepsis gibi inflamasyonun belirgin olduğu durumlarda proinflamatuvar sitokinler tarafından tetiklenir. NOS-2'nin aşırı tetiklendiği durumlarda üretilen NO ortamdaki reaktif oksijen türleri, süperoksitler ile tepkimeye girerek peroksinitrit üretir. Peroksinitritler sepsis ilişkili akut böbrek hasarında da önemli rol oynar (115). Yapılan bir çalışmada sepsiste hipodinamik fazda sıçan torasik aortunda kontrol grubunda ACh gevşeme yanıtının %20'sinden NOS-2 yolağı sorumluyken, sepsis modeli oluşturulan hayvanda ACh gevşemesinin %52'sinden sorumlu olduğu belirtilmiştir, ek olarak da NOS-1 ve NOS-3 yolakları ve NOS dışı yolakların septik hayvandaki ACh gevşemesinde paylarının azaldığı ifade edilmiştir (113). Bu çalışma öncesi yapmış olduğumuz ön deneylerde de renal arter dallarında ACh gevşemesinin L-NAME ve indometazin varlığında kaybolduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada da daha önce söylendiği gibi empagliflozin tedavisinin LPS verilmesiyle kalpte artan iNOS ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (54). Bu çalışmanın ilginç bir yanı i.p. 5mg LPS verilen farede 8 saat sonra torasik aorta yanıtları incelendiğinde ACh gevşeme yanıtlarının azalması empagliflozin tedavisinin de bu azalmayı geri çevirmesidir. İlk bakışta bu tez çalışmasıyla sonuçlar açısından çelişki varmış gibi düşünülse de aslında bu çalışma muhtemelen hiperdinamik fazda yapılan bir çalışma olup ACh gevşeme yanıtları bu sebeple azalmıştır. Empagliflozin ise bu azalmayı bizim çalışmamızda olduğu gibi geri çevirmiştir. İlginç olan empagliflozinin bahsi geçen yayında torasik aorta gevşeme yanıtlarındaki azalmayı, bizim çalışmamızda ise torasik aorta gevşeme yanıtlarındaki artışı ve renal arter ikinci dalı ve izole perfüze böbrekteki gevşeme yanıtlarındaki azaltmayı düzeltmesidir.

Empagliflozinin asetilkolin gevşetici cevaplarına olan etkisi yukarıda açıklanan iNOS ekspresyonunu azaltıcı etkisiyle, AMPK yolağı üzerinden olduğu düşünülen TNF- $\alpha$  ve nitrit düzeylerini azaltıcı etkisi ile açıklanabilir. Sistemik yanıt ile bölgesel yanıtlar



arasında görülen farklılıklar ise AT-II yanıtlarında görüldüğü gibi vücudun kanı daha öncelikli olan dokulara yönlendirebilmesiyle açıklanabilir.

### **5.7. Renal arter dallarında sepsiste SNP gevşeme yanıtları değişmezken izole perfüze böbrekte ve aortta azaldı.**

Nitrik oksit donörü olan SNP yanıtları incelendiğinde renal arter dallarında gruplar arasında fark görülmezken izole perfüze böbrek düzeneğinde ve aortta LPS'de görülen SNP gevşemesi azalması empagliflozin tedavisi ile geri dönmedi. Renal arter ikinci dalında SNP Emax yanıtı değişmedi. Renal arter dallarında ACh yanıtları azalırken SNP yanıtlarının değişmemesi bu damarlarda sepsis modeli ile oluşan endotel hasarına ve vasküler düz kas hücrelerinin bu modelden endotel kadar zarar görmediğine işaret edebilir. Literatüre bakıldığında yapılan bir çalışmada sepsis modelinde sıçan aortunda NO yolağında rol alan soluble guanilat siklaz (sGC) mRNA ve protein ekspresyonları zamana bağlı şekilde incelenmiş, sepsis modelinin indüklenmesinden sonra ekspresyonların 24.saate kadar giderek arttığı gösterilmiştir (103). Bu durum sepsis modelleri ile yapılacak deneylerde ölçüm zamanının SNP sonuçlarını etkileyebileceğini göstermesi açısından önemlidir. Literatüre bakıldığında çoğunlukla sepsiste arter SNP cevaplarında azalma görülmekle birlikte bazı çalışmalarda da bu cevapların değişmediği görülmektedir (106, 116, 117). Ancak aort ve izole perfüze böbrek düzeneğinde görülen SNP yanıtlarındaki azalma yukarıda bahsedildiği gibi ölçüm saatiyle de ilişkili olabilir, ek olarak yayınlarda kullanılan sepsis metodu, LPS tipi gibi diğer değişkenlere bağlı olarak da SNP ekspresyonu ve dolayısıyla SNP gevşeme yanıtları değişebilir. Empagliflozin tedavisi aort ve izole perfüze böbrek düzeneğindeki azalan SNP gevşeme yanıtlarına düzeltici etki göstermemiştir.

### **5.8. Renal arter dallarında sepsiste elektriksel alan stimülasyonu ilişkili kasılma yanıtları azaldı, empagliflozin bu azalmayı düzeltici etki yapmadı.**

Miyograf EAS yanıtları değerlendirildiğinde hem renal arter ikinci dalında hem de segmental arterde EAS ile oluşan kasılma yanıtlarının LPS ve LPS+Empa grubunda azaldığı, LPS+Empa grubu ile LPS grubu arasında anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

Sıçan renal arter ikinci dalı ve segmental arterde sepsis ilişkili akut böbrek hasarı modelinde EAS kasılma yanıtlarında görülen azalma bilindiği kadarıyla literatürde ilk kez gösterilmiştir. Bu damarlarda EAS kasılma yanıtlarının hangi mekanizmalar aracılığıyla oluştuğunu araştırmak amacıyla yapılan ön deneylerde guanetidin inkübasyonu sonrasında EAS uygulanınca kasılma yanıtlarının kaybolduğu, guanetidin inkübasyonu sonrası PE verilip ardından EAS uygulanınca da herhangi bir gevşeme yanıtının oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular EAS yanıtlarının adrenerjik kökenli olduğunu ve EAS yanıtları içerisinde herhangi bir gevşetici bileşen bulunmadığını göstermektedir. 2022 yılında domuz interlobar arterlerinde yapılan bir çalışmada da EAS kasılma yanıtlarının NOS inhibitörü ve siklooksijenaz inhibitörü diklofenak varlığında değişmediği gösterilmiştir, ek olarak bu çalışmada tetrodotoksin varlığında EAS kasılma yanıtlarının %96 azaldığı ve prazosin varlığında %21 azaldığı gösterilmiş olup bu veriler de EAS yanıtları içerisinde gevşetici bir bileşen bulunmadığına, EAS kasılmalarının adrenerjik ve nörojenik kökenli olduğuna işaret eder (118). 2021 yılında yapılan bir araştırmada da tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) reseptör antagonisti ve TXA<sub>2</sub> sentaz inhibitörü picotamidin domuz interlobar arterlerinde EAS yanıtlarını %50 inhibe ettiği gösterilmiştir (119). Bu çalışmada LPS grubunda EAS kasılma yanıtlarının azalması adrenerjik sistemde, TXA<sub>2</sub> ve ilişkili olduğu yollarda veya normalde EAS ile uyarılan sinirsel iletimde hasar olması ile açıklanmıştır. Fenilefrin yanıtlarındaki azalmada da değinildiği gibi bu durum  $\alpha_1$  adrenerjik reseptör ekspresyonunda azalma, hücre içi ikincil haberci düzeylerinde azalma, ortam Ca<sup>2+</sup> düzeylerinde azalma, GRK-2 ekspresyonunda azalma ile de ilişkili olabilir (107, 108). Empagliflozin tedavisi EAS kasılma yanıtlarındaki bozulmayı düzeltmemiştir. SGLT-2 reseptörünün sempatik sinir sistemi tarafından ekspresyonunun artırılabilirliğini ve SGLT-2 inhibisyonunun da sempatik sinir sistemini etkileyebileceğini öne süren yayınlar mevcuttur (120-122). Sepsiste de sempatik aktivite artışı bilinmektedir (16), ancak empagliflozin tedavisi ile EAS kasılma yanıtlarındaki bozulma düzelmemiştir.

**5.9. Empagliflozin tedavisi sepsiste karaciğer ve ileumda görülen histopatolojik hasarı düzeltici etki yaparken böbrekte görülen histopatolojik hasara karşı düzeltici etki göstermedi.**

Histopatolojik değerlendirme için bu çalışmada böbrek, karaciğer ve ileum örnekleri alındı. Böbrek histopatolojik değerlendirmesinde LPS ve LPS+Empa grubunda kontrole göre anlamlı şekilde histopatolojik hasar tespit edilirken LPS+Empa grubunun LPS grubu ile arasında fark olmadığı görüldü. Sepsis ilişkili böbrek hasarı beklenen bir bulgu olup sebebi doku hipoperfüzyonu olabileceği gibi kontrolsüz inflamasyon, apoptoz ve koagülasyon süreçlerindeki bozulmalar bu hasarda rol oynar (123). Bu çalışmada da oluşturulan sepsis ilişkili akut böbrek hasarı modeli, böbrek histopatolojisinde de gösterilmiştir. Empagliflozin tedavisinde ise histopatolojik olarak akut böbrek hasarını düzeltici etki gözlemlenmemiştir, bu durum yukarıda bahsedilen ilacın idrar lökosit varlığı, üreter perfüzyon çıkışı olumlu sonuçları ile ve daha önce yapılan sepsiste böbrek histopatolojisinde empagliflozinin düzeltici etkisinin gösterildiği çalışma ile uyumsuzdur (57).

Empagliflozin tedavisinin bu çalışmada böbrekte histopatolojik olarak düzeltici etki göstermemesinin sebebi ilacın verilmiş süresi, verilmiş yolu, verilmiş miktarı gibi değişkenlere bağlı olabilir. İlacın kan akımı ölçümlerinde de gösterildiği gibi renal arterde sepsis ilişkili akut böbrek hasarı modelinde azalan renal arter kan akımını geri döndürmemesi ile de ilişkili olabilir. Bu çalışmanın fonksiyonel değerlendirmeler esas alınarak seçilen protokolüne yukarıda değinilmiş olup elde edilen verilerde bazı fonksiyonel değerlendirmelerde empagliflozinin düzeltici etkisi görülebilmekle birlikte histopatolojik değerlendirmelerde empagliflozin tedavisi etki göstermemiştir.

Karaciğer histopatolojik değerlendirmesinde LPS grubunda kontrole göre anlamlı şekilde organ hasarı tespit edilmiş olup bu durum literatür bilgileri ile uyumludur (123). LPS+Empa grubuna bakıldığında ise histopatolojik skorun LPS grubuna göre azaldığı görüldü. Belirgin nekrobiyotik odak, nekroz ve belirgin inflamatuvar hücre infiltrasyonu (histopatolojik skor 3-4) kontrol ve Empa gruplarında görülmezken (%0), LPS grubundaki örneklerde görülme oranının %71,4 olduğu,

empagliflozin tedavisinde ise bu oranın %20'ye düştüğü görüldü. LPS grubundaki fark bizim ölçümlerimizde portal vende de tespit ettiğimiz hipoperfüzyon ile veya kontrolsüz inflamasyonun tetiklediği doku hasarı ile ilişkili olabilir.

İleum için iskemik alanların yüzdesi açısından yapılan histopatolojik değerlendirmede ise LPS grubunda iskemik alanlarda anlamlı bir artış görülmüş olup bu sonuç literatür bilgileri ile uyumludur (124, 125). Sepsiste görülen hipoperfüzyon, doku perfüzyonundaki bozulma bu durumu açıklayabilmekle birlikte, bizim sonuçlarımızda da barsak dolaşımına katkısı olan superior mezenter arterde kan akım hızının azaldığı tespit edilmiştir. LPS+Empa tedavisinin tespit edilen bu histopatolojik hasarı geri çevirdiği görülmüştür.

Karaciğer ve ileum histopatolojik değerlendirmesindeki bu sonuçlar çalışmada kullanılan modelin sepsiste olduğu gibi böbrek dışındaki diğer organlarda meydana getirdiği hasarı göstermesi açısından da önemlidir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada SGLT-2 inhibitörü olan empagliflozinin sepsis ilişkili akut böbrek hasarı modelinde renal ve fizyolojik fonksiyonlara etkisi incelenmiştir. LPS ile indüklenen sıçan sepsis modelinde empagliflozin ön tedavisinin, akut böbrek hasarı ile birlikte böbrek damar yatağı, renal arter dalları ve aort fonksiyonel cevapları üzerine etkileri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir, elde edilen sonuçlar ve öneriler şunlardır:

1. Empagliflozin tedavisi sepsis ilişkili akut böbrek hasarında atılımı artan idrar lökosit miktarını azaltmıştır.
2. İzole perfüze böbrek düzeneğinde, sepsis ilişkili akut böbrek hasarında azalan üreter perfüze çıkışı üzerine empagliflozin ön tedavisinin olumlu etkileri vardır.
3. Renal arter dallarında sepsiste fenilefrin kasılma yanıtları azalmış olup empagliflozin ön tedavisinin bu azalma üzerine düzeltici etkileri vardır.
4. Renal arter ikinci dalında sepsiste artan anjiyotensin-II kasılma yanıtları üzerine empagliflozin ön tedavisinin düzeltici etkileri vardır.
5. Renal arter dallarında sepsiste azalan asetilkolin gevşeme yanıtları üzerine empagliflozin ön tedavisinin düzeltici etkileri vardır.
6. Empagliflozin ön tedavisi, sepsiste karaciğer ve ileumda görülen histopatolojik hasara önleyici etki yaparken böbrekte tespit edilen histopatolojik hasara karşı koruyucu etki göstermemektedir.
7. Empagliflozin, renal arter dalları ve izole perfüze böbrek düzeneğinde gösterilen etkileri ile sepsis ilişkili akut böbrek hasarı tedavisinde fonksiyonel olarak etkili olabilir. Farklı doz, farklı veriliş yolu ve farklı tedavi sürelerinde empagliflozin tedavisinin sepsis üzerine olan diğer olası düzeltici etki mekanizmalarının değerlendirilmesi amacıyla ileri çalışmalar yapılabilir.
8. Sepsiste oluşan akut böbrek hasarı incelenirken ilacın kronik kullanımı mutlaka araştırılmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Klenzak J, Himmelfarb J. Sepsis and the kidney. *Critical care clinics*. 2005;21(2):211-22.
2. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(2):159-69.
3. Ympa YP, Sakr Y, Reinhart K, Vincent J-L. Has mortality from acute renal failure decreased? A systematic review of the literature. *The American Journal of Medicine*. 2005;118(8):827-32.
4. Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(6):999-1006.
5. Cohen AH. Renal anatomy and basic concepts and methods in renal pathology. *Fundamentals of Renal Pathology*: Springer; 2006. p. 3-17.
6. Dibona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiological reviews*. 1997;77(1):75-197.
7. Malpas SC, Leonard BL. Neural regulation of renal blood flow: a re-examination. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2000;27(12):956-64.
8. Schrier R, De Wardener H. Tubular reabsorption of sodium ion: influence of factors other than aldosterone and glomerular filtration rate. *New England Journal of Medicine*. 1971;285(23):1292-303.
9. Barajas L, Liu L, Powers K. Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1992;70(5):735-49.
10. Luff SE, Hengstberger SG, McLachlan EM, Anderson W. Distribution of sympathetic neuroeffector junctions in the juxtaglomerular region of the rabbit kidney. *Journal of the autonomic nervous system*. 1992;40(3):239-53.
11. Moriyama N, Kurooka Y, Nasu K, Akiyama K, Takeuchi T, Nishimatsu H, et al. Distribution of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtype mRNA and identification of subtype responsible for renovascular contraction in human renal artery. *Life sciences*. 2000;66(10):915-26.
12. Salomonsson M, Brännström K, Arendshorst WJ.  $\alpha$ 1-Adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000;278(1):F138-F47.
13. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10.
14. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):762-74.
15. Mårtensson J, Bellomo R. Sepsis-induced acute kidney injury. *Critical care clinics*. 2015;31(4):649-60.
16. Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, Poputnikov D, et al. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of  $\beta$ 1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats\*. *Critical Care Medicine*. 2010;38(2).
17. Zhou M, Hank Simms H, Wang P. Increased gut-derived norepinephrine release in sepsis: up-regulation of intestinal tyrosine hydroxylase. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1689(3):212-8.
18. Miksa M, Wu R, Zhou M, Wang P. Sympathetic excitotoxicity in sepsis: pro-inflammatory priming of macrophages by norepinephrine. *Front Biosci*. 2005;10(5):2217-29.

19. Yang S, Koo DJ, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. Gut-derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(6):G1274-81.
20. Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med*. 2015;277(3):277-93.
21. De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence*. 2014;5(1):73-9.
22. Mayeux PR, MacMillan-Crow LA. Pharmacological targets in the renal peritubular microenvironment: implications for therapy for sepsis-induced acute kidney injury. *Pharmacol Ther*. 2012;134(2):139-55.
23. Boffa JJ, Arendshorst WJ. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(1):117-24.
24. Matejovic M, Valesova L, Benes J, Sykora R, Hrstka R, Chvojka J. Molecular differences in susceptibility of the kidney to sepsis-induced kidney injury. *BMC Nephrol*. 2017;18(1):183.
25. Leisman DE, Fernandes TD, Bijol V, Abraham MN, Lehman JR, Taylor MD, et al. Impaired angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney Int*. 2021;99(1):148-60.
26. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(11):813-22.
27. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE. Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Critical care medicine*. 2002;30(5):S225-S8.
28. Koçkara A, Kayataş M. Renal cell apoptosis and new treatment options in sepsis-induced acute kidney injury. *Renal failure*. 2013;35(2):291-4.
29. Lerolle N, Nochy D, Guérot E, Bruneval P, Fagon J-Y, Diehl J-L, et al. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive care medicine*. 2010;36(3):471-8.
30. Lee S-Y, Lee Y-S, Choi H-M, Ko Y-S, Lee H-Y, Jo S-K, et al. Distinct pathophysiologic mechanisms of septic acute kidney injury: role of immune suppression and renal tubular cell apoptosis in murine model of septic acute kidney injury. *Critical care medicine*. 2012;40(11):2997-3006.
31. Homsí E, Janino P, De Faria J. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney international*. 2006;69(8):1385-92.
32. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev*. 2011;243(1):206-14.
33. Wang Z, Gu Z, Hou Q, Chen W, Mu D, Zhang Y, et al. Zebrafish GSDMEb Cleavage-Gated Pyroptosis Drives Septic Acute Kidney Injury In Vivo. *The Journal of Immunology*. 2020;204(7):1929.
34. Ye Z, Zhang L, Li R, Dong W, Liu S, Li Z, et al. Caspase-11 Mediates Pyroptosis of Tubular Epithelial Cells and Septic Acute Kidney Injury. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2019;44(4):465-78.
35. Garrido AG, Figueiredo LFPd, Silva MR. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2004;19:82-8.
36. Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*. 2008;30(7):53-9.
37. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(10):2868-78.
38. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*. 1980;29(2):189-201.

39. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg*. 2001;88(1):22-30.
40. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*. 1990;49(2):186-96.
41. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison Of The Mortality And Inflammatory Response Of Two Models Of Sepsis: Lipopolysaccharide Vs. Cecal Ligation And Puncture. *Shock*. 2000;13(2):110-6.
42. Molitoris BA. Renal blood flow in sepsis: a complex issue. *Critical Care*. 2005;9(4):327.
43. Deitch EA. Animal Models Of Sepsis And Shock: A Review And Lessons Learned. *Shock*. 1998;9(1).
44. Langenberg C, Bellomo R, May C, Wan L, Egi M, Morgera S. Renal blood flow in sepsis. *Critical Care*. 2005;9(4):R363.
45. Piperidou A, Loutradis C, Sarafidis P. SGLT-2 inhibitors and nephroprotection: current evidence and future perspectives. *J Hum Hypertens*. 2021;35(1):12-25.
46. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2117-28.
47. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, et al. Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(15):1413-24.
48. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, et al. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(4):323-34.
49. Uthman L, Baartscheer A, Bleijlevens B, Schumacher CA, Fiolet JWT, Koeman A, et al. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na(+)/H(+) exchanger, lowering of cytosolic Na(+) and vasodilation. *Diabetologia*. 2018;61(3):722-6.
50. Herat LY, Magno AL, Rudnicka C, Hricova J, Carnagarin R, Ward NC, et al. SGLT2 Inhibitor-Induced Sympathoinhibition: A Novel Mechanism for Cardiorenal Protection. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(2):169-79.
51. Kowalska K, Walczak J, Femlak J, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J. Empagliflozin-A New Chance for Patients with Chronic Heart Failure. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;15(1).
52. Heise T, Jordan J, Wanner C, Heer M, Macha S, Mattheus M, et al. Pharmacodynamic Effects of Single and Multiple Doses of Empagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes. *Clinical Therapeutics*. 2016;38(10):2265-76.
53. Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp D, et al. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2012;14(1):83-90.
54. Koyani CN, Plastira I, Sourij H, Hallström S, Schmidt A, Rainer PP, et al. Empagliflozin protects heart from inflammation and energy depletion via AMPK activation. *Pharmacological Research*. 2020;158:104870.
55. Byrne NJ, Matsumura N, Maayah ZH, Ferdaoussi M, Takahara S, Darwesh AM, et al. Empagliflozin blunts worsening cardiac dysfunction associated with reduced NLRP3 (nucleotide-binding domain-like receptor protein 3) inflammasome activation in heart failure. *Circulation: Heart Failure*. 2020;13(1):e006277.
56. Pirklbauer M. Anti-inflammatory potential of Empagliflozin. *Inflammopharmacology*. 2021;29(2):573-6.



57. Maayah ZH, Ferdaoussi M, Takahara S, Soni S, Dyck JRB. Empagliflozin suppresses inflammation and protects against acute septic renal injury. *Inflammopharmacology*. 2021;29(1):269-79.
58. Andreadou I, Efentakis P, Balafas E, Togliatto G, Davos CH, Varela A, et al. Empagliflozin Limits Myocardial Infarction in Vivo and Cell Death in Vitro: Role of STAT3, Mitochondria, and Redox Aspects. *Frontiers in Physiology*. 2017;8.
59. Su S-a, Yang D, Zhu W, Cai Z, Zhang N, Zhao L, et al. Interleukin-17A mediates cardiomyocyte apoptosis through Stat3-iNOS pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016;1863(11):2784-94.
60. Ange M, De Poortere J, Ginion A, Battault S, Dechamps M, Muccioli GG, et al. Canagliflozin protects against sepsis capillary leak syndrome by activating endothelial alpha1AMPK. *Sci Rep*. 2021;11(1):13700.
61. Korkmaz-Icoz S, Kocer C, Sayour AA, Kraft P, Benker MI, Abulizi S, et al. The Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitor Canagliflozin Alleviates Endothelial Dysfunction Following In Vitro Vascular Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15).
62. Mancini SJ, Boyd D, Katwan OJ, Strembitska A, Almabrouk TA, Kennedy S, et al. Canagliflozin inhibits interleukin-1 $\beta$ -stimulated cytokine and chemokine secretion in vascular endothelial cells by AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms. *Scientific Reports*. 2018;8(1):5276.
63. El-Daly M, Pulakazhi Venu VK, Saifeddine M, Mihara K, Kang S, Fedak PWM, et al. Hyperglycaemic impairment of PAR2-mediated vasodilation: Prevention by inhibition of aortic endothelial sodium-glucose-co-Transporter-2 and minimizing oxidative stress. *Vascular Pharmacology*. 2018;109:56-71.
64. Han Y, Cho YE, Ayon R, Guo R, Youssef KD, Pan M, et al. SGLT inhibitors attenuate NO-dependent vascular relaxation in the pulmonary artery but not in the coronary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(9):L1027-36.
65. Stefano AD, Tesauro M, Daniele ND, Vizioli G, Schinzari F, Cardillo C. Mechanisms of SGLT2 (Sodium-Glucose Transporter Type 2) Inhibition-Induced Relaxation in Arteries From Human Visceral Adipose Tissue. *Hypertension*. 2021;77(2):729-38.
66. Gaspari T, Spizzo I, Liu H, Hu Y, Simpson RW, Widdop RE, et al. Dapagliflozin attenuates human vascular endothelial cell activation and induces vasorelaxation: A potential mechanism for inhibition of atherogenesis. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 2018;15(1):64-73.
67. Jaswal DS, Cui X, Torabi-Parizi P, Ohanjanian L, Sampath-Kumar H, Fitz Y, et al. Bacillus anthracis Edema Toxin Increases Fractional Free Water and Sodium Reabsorption in an Isolated Perfused Rat Kidney Model. *Infect Immun*. 2017;85(7).
68. Xu W, Lu Y, Yao J, Li Z, Chen Z, Wang G, et al. Novel Role of Resveratrol: Suppression of High-Mobility Group Protein Box 1 Nucleocytoplasmic Translocation by the Upregulation of Sirtuin 1 in Sepsis-Induced Liver Injury. *Shock*. 2014;42(5).
69. Nanayakkara S, Komiya T, Ratnatunga N, Senevirathna STMLD, Harada KH, Hitomi T, et al. Tubulointerstitial damage as the major pathological lesion in endemic chronic kidney disease among farmers in North Central Province of Sri Lanka. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2012;17(3):213-21.
70. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*. 1970;101(4):478-83.
71. Oguri S, Motegi K, Iwakura Y, Endo Y. Primary Role of Interleukin-1 $\alpha$ ; and Interleukin-1 $\beta$ ; in Lipopolysaccharide-Induced Hypoglycemia in Mice. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2002;9(6):1307-12.

72. Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of Biomedical Science*. 2017;24(1):60.
73. Sarashina A, Koiwai K, Seman LJ, Yamamura N, Taniguchi A, Negishi T, et al. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Single Doses of Empagliflozin, a Sodium Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitor, in Healthy Japanese Subjects. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2013;28(3):213-9.
74. Seman L, Macha S, Nehmiz G, Simons G, Ren B, Pinnetti S, et al. Empagliflozin (BI 10773), a potent and selective SGLT2 inhibitor, induces dose-dependent glucosuria in healthy subjects. *Clinical pharmacology in drug development*. 2013;2(2):152-61.
75. Huang Z-S, Xie D-Q, Xu L-J, Huang C-S, Zheng M, Chen Y-J, et al. Tetramethylpyrazine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Sepsis in Rats via Protecting Blood–Brain Barrier, Impairing Inflammation and Nitrous Oxide Systems. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11.
76. Toklu HZ, Uysal MK, Kabasakal L, Sirvanci S, Ercan F, Kaya M. The Effects of Riluzole on Neurological, Brain Biochemical, and Histological Changes in Early and Late Term of Sepsis in Rats. *Journal of Surgical Research*. 2009;152(2):238-48.
77. Zafrani L, Ergin B, Kapucu A, Ince C. Blood transfusion improves renal oxygenation and renal function in sepsis-induced acute kidney injury in rats. *Critical Care*. 2016;20(1):406.
78. Wang W, Falk SA, Jittikanont S, Gengaro PE, Edelstein CL, Schrier RW. Protective effect of renal denervation on normotensive endotoxemia-induced acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283(3):F583-7.
79. Di Giantomasso D, May CN, Bellomo R. Vital Organ Blood Flow During Hyperdynamic Sepsis. *Chest*. 2003;124(3):1053-9.
80. Cohen RI, Hassell AM, Marzouk K, Marini C, Liu SF, Scharf SM. Renal effects of nitric oxide in endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10 Pt 1):1890-5.
81. Yang S, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH, Wang P. Differential Alterations in Systemic and Regional Oxygen Delivery and Consumption during the Early and Late Stages of Sepsis. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 1999;47(4).
82. Shieh P, Zhou M, Ornan DA, Chaudry IH, Wang P. Upregulation Of Inducible Nitric Oxide Synthase And Nitric Oxide Occurs Later Than The Onset Of The Hyperdynamic Response During Sepsis. *Shock*. 2000;13(4).
83. Levy RJ, Deutschman CS. Evaluating Myocardial Depression In Sepsis. *Shock*. 2004;22(1).
84. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Increase in hepatic blood flow during early sepsis is due to increased portal blood flow. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1991;261(6):R1507-R12.
85. Wright CE, Rees DD, Moncada S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*. 1992;26(1):48-57.
86. Schiffer ER, Mentha G, Schwieger IM, Morel DR. Sequential changes in the splanchnic circulation during continuous endotoxin infusion in sedated sheep: evidence for a selective increase of hepatic artery blood flow and loss of the hepatic arterial buffer response. *Acta Physiol Scand*. 1993;147(3):251-61.
87. Pastor CM, Suter PM. Hepatic Hemodynamics and Cell Functions in Human and Experimental Sepsis. *Anesthesia & Analgesia*. 1999;89(2).
88. Hildebrand LB, Krejci V, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. *Critical Care Medicine*. 2000;28(9).
89. Krejci V, Hildebrand LB, Sigurdsson GH. Effects of epinephrine, norepinephrine, and phenylephrine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract in sepsis\*. *Critical Care Medicine*. 2006;34(5).

90. Theuer CJ, Wilson MA, Steeb GD, Garrison RN. Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia. *Circ Shock*. 1993;40(1):61-8.
91. Simanenkova A, Minasian S, Karonova T, Vlasov T, Timkina N, Khalzova A, et al. Comparative evaluation of empagliflozin, canagliflozin and sitagliptin cardioprotective properties in rats with experimental type 2 diabetes mellitus. *Diabetes mellitus*. 2021;24(2):111-21.
92. Williams JM, Murphy SR, Wu W, Border JJ, Fan F, Roman RJ. Renoprotective effects of empagliflozin in type 1 and type 2 models of diabetic nephropathy superimposed with hypertension. *GeroScience*. 2022.
93. Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Maione M, Lai V, Lee A, et al. Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. *Circulation*. 2014;129(5):587-97.
94. Gemhardt F, Bartaun C, Jarzewska N, Mayoux E, Todorov VT, Hohenstein B, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates early features of diabetic nephropathy in BTBR ob/ob type 2 diabetic mice with and without hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(3):F317-25.
95. Benetti E, Mastrocola R, Vitarelli G, Cutrin JC, Nigro D, Chiazza F, et al. Empagliflozin Protects against Diet-Induced NLRP-3 Inflammasome Activation and Lipid Accumulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;359(1):45-53.
96. Soydan G, Tekes E, Tuncer M. Short-term and long-term FK506 treatment alters the vascular reactivity of renal and mesenteric vascular beds. *JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL SCIENCES*. 2006;102(4):359-67.
97. Vandongen R, Peart WS, Boyd GW. Adrenergic Stimulation of Renin Secretion in the Isolated Perfused Rat Kidney. *Circulation Research*. 1973;32(2):290-6.
98. Groesdonk HV, Bauer A, Kreft B, Heringlake M, Paarmann H, Pagel H. Urodilatin and pentoxifylline prevent the early onset of Escherichia coli-induced acute renal failure in a model of isolated perfused rat kidney. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32(2):81-90.
99. Meurer M, Ebert K, Schweda F, Höcherl K. The renal vasodilatory effect of prostaglandins is ameliorated in isolated-perfused kidneys of endotoxemic mice. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2018;470(11):1691-703.
100. Heesen BJ, Hotchkiss RS, Karl IE. Sepsis decreases phenylephrine- and KCl-induced aortic ring contraction and decreases the frequency of oscillations in active wall tension. *Shock (Augusta, Ga)*. 1994;2(2):106-12.
101. Weigert A, Higa E, Niederberger M, McMurtry IF, Reynolds M, Schrier RW. Expression and preferential inhibition of inducible nitric oxide synthase in aortas of endotoxemic rats. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1995;5(12):2067-72.
102. Rees DD, Celtek S, Palmer RMJ, Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: An insight into endotoxin shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;173(2):541-7.
103. Fernandes D, Sordi R, Pacheco LK, Nardi GM, Heckert BT, Villela CG, et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(3):991-9.
104. McKenna TM, Martin FM, Chernow B, Briglia FA. Vascular endothelium contributes to decreased aortic contractility in experimental sepsis. *Circ Shock*. 1986;19(3):267-73.
105. Fink MP, Homer LD, Fletcher JR. Diminished pressor response to exogenous norepinephrine and angiotensin II in septic, unanesthetized rats: Evidence for a prostaglandin-mediated effect. *Journal of Surgical Research*. 1985;38(4):335-42.

106. Kandasamy K, Choudhury S, Singh V, Addison MP, Darzi SA, Kasa JK, et al. Erythropoietin Reverses Sepsis-Induced Vasoplegia to Norepinephrine Through Preservation of  $\alpha$ 1D-Adrenoceptor mRNA Expression and Inhibition of GRK2-Mediated Desensitization in Mouse Aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2016;21(1):100-13.
107. Carcillo JA, Litten RZ, Suba EA, Roth BL. Alterations in rat aortic alpha 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenergic stimulated phosphoinositide hydrolysis in intraperitoneal sepsis. *Circ Shock*. 1988;26(3):331-9.
108. Carcillo JA, Litten RZ, Roth BL. Norepinephrine-induced phosphorylation of a 25 kd phosphoprotein in rat aorta is altered in intraperitoneal sepsis. *Circulatory shock*. 1989;28(3):257-65.
109. Li T, Croce K, Winqvist RJ. Regional differences in the effects of septic shock on vascular reactivity in the rabbit. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1992;261(3):959.
110. Tarpey SB, Bennett T, Randall MD, Gardiner SM. Differential effects of endotoxaemia on pressor and vasoconstrictor actions of angiotensin II and arginine vasopressin in conscious rats. *Br J Pharmacol*. 1998;123(7):1367-74.
111. Baker CH, Sutton ET, Dietz JR. Endotoxin alteration of muscle microvascular renin-angiotensin responses. *Circulatory shock*. 1992;36(3):224-30.
112. Bucher M, Ittner K-P, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Downregulation of Angiotensin II Type 1 Receptors During Sepsis. *Hypertension*. 2001;38(2):177-82.
113. Beach PK, Spain DA, Kawabe T, Harris PD, Garrison RN. Sepsis Increases NOS-2 Activity and Decreases Non-NOS-Mediated Acetylcholine-Induced Dilation in Rat Aorta. *Journal of Surgical Research*. 2001;96(1):17-22.
114. Araújo AV, Ferezin CZ, Rodrigues GJ, Lunardi CN, Vercesi JA, Grando MD, et al. Prostacyclin, not only nitric oxide, is a mediator of the vasorelaxation induced by acetylcholine in aortas from rats submitted to cecal ligation and perforation (CLP). *Vascular Pharmacology*. 2011;54(1):44-51.
115. Heemskerk S, Masereeuw R, Russel FGM, Pickkers P. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2009;5(11):629-40.
116. Subramani J, Kathirvel K, Leo MDM, Kuntamallappanavar G, Uttam Singh T, Mishra SK. Atorvastatin Restores the Impaired Vascular Endothelium-dependent Relaxations Mediated by Nitric Oxide and Endothelium-derived Hyperpolarizing Factors but Not Hypotension in Sepsis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2009;54(6):526-34.
117. Uğurel SS, Dalaklıoğlu S, Taşatargil A, Kuşçu N, Özenci ÇÇ. Resveratrol prevented lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in rat thoracic aorta through increased eNOS expression. *Balkan Medical Journal*. 2016;33(2):138-43.
118. Huang R, Li B, Tamalunas A, Waidelich R, Stief CG, Hennenberg M. Inhibition of neurogenic contractions in renal arteries and of cholinergic contractions in coronary arteries by the presumed inhibitor of ADP-ribosylation factor 6, NAV2729. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2022;395(4):471-85.
119. Li B, Huang R, Wang R, Liu Y, Stief CG, Hennenberg M. Picotamide inhibits a wide spectrum of agonist-induced smooth muscle contractions in porcine renal interlobar and coronary arteries. *Pharmacol Res Perspect*. 2021;9(3):e00771.
120. Elliott RH, Matthews VB, Rudnicka C, Schlaich MP. Is it time to think about the sodium glucose co-transporter 2 sympathetically? *Nephrology (Carlton)*. 2016;21(4):286-94.
121. Raza S, Osasan S, Sethia S, Batool T, Bambhroliya Z, Sandrugu J, et al. A Systematic Review of Sodium-Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitors and Sympathetic Nervous

System Inhibition: An Underrated Mechanism of Cardiorenal Protection. *Cureus*. 2022;14(6):e26313.

122. Liu Y, Xu J, Wu M, Xu B, Kang L. Empagliflozin protects against atherosclerosis progression by modulating lipid profiles and sympathetic activity. *Lipids Health Dis*. 2021;20(1):5.

123. Garofalo AM, Lorente-Ros M, Goncalvez G, Carriedo D, Ballén-Barragán A, Villar-Fernández A, et al. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2019;7(1):45.

124. Arslan MS, Basuguy E, Ibiloglu I, Bozdemir E, Zeytun H, Sahin A, et al. Effects of *Ecballium elaterium* on proinflammatory cytokines in a rat model of sepsis. *Journal of Investigative Surgery*. 2016;29(6):399-404.

125. Yeh Y-C, Yu LC-H, Wu C-Y, Cheng Y-J, Lee C-T, Sun W-Z, et al. Effects of endotoxin absorber hemoperfusion on microcirculation in septic pigs. *Journal of Surgical Research*. 2017;211:242-50.