



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**SODYUM GLUKOZ KOTRANSPORTER 2 İNHİBİTÖRÜ
DAPAGLİFLOZİNİN TİP 2 DİABETİK RATLARDA
KARDİYOVASKÜLER KOMPLİKASYONLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

İrem KARAÖMERLİOĞLU

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN**

**ANKARA
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SODYUM GLUKOZ KOTRANSPORTER 2 İNHİBİTÖRÜ
DAPAGLİFLOZİNİN TİP 2 DİABETİK RATLARDA
KARDİYOVASKÜLER KOMPLİKASYONLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

İrem KARAÖMERLİOĞLU

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün
16L0237006 ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumunun 115S564 numaralı
projeleri ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2020**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sodyum glukoz kotransporter 2 inhibitörü dapagliflozinin tip 2 diabetik ratlarda kardiyovasküler komplikasyonlar üzerindeki etkileri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan, Prof. Dr. V. Melih Altan ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: İrem Karaömerlioğlu

Tarih: 27.07.2020

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xiv
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması	1
1.1.2. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi	4
1.1.3. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	6
1.1.4. Diabetes Mellitus'un Tedavisi	9
1.1.5. Sodyum Glukoz Kotransport 2 İnhibitörleri	12
1.2. Beta Adrenerjik Reseptörler	21
1.2.1. Beta Adrenerjik Reseptör Alt Tipleri	22
1.2.2. Beta Adrenerjik Reseptörlerin Yapısal Özellikleri	22
1.2.3. Beta Adrenerjik Reseptörlerin Kardiyak Fonksiyonlardaki Rolü	24
1.2.4. Diabetik Kalpte Beta Adrenerjik Reseptörler	29
1.3. Amaç	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1. Kullanılan Gereçler	33
2.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	33
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
2.2. Kullanılan Deney Hayvanları	39
2.2.1. Deney Grupları	39
2.3. Kullanılan Yöntemler	40
2.3.1. Diabetin Oluşturulması	40
2.3.2. Tedavi	40
2.3.2. Kan Şekeri Ölçümü	43
2.3.4. Serum Lipid Düzeylerinin Ölçümü	44
2.3.5. Deney Öncesi Yapılan İşlemler	44
2.3.6. <i>In-vivo</i> Kardiyak Deneyler	44
2.3.7. Papiller Kas Deneyleri	45
2.3.8. Langendorff Perfüze Kalp Deneyi	46
2.3.9. Western Blot Deneyleri	47
2.3.10. İstatistiksel Analiz	59
3. BULGULAR	60
3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri	60
3.1.1. Beden Ağırlığı	60
3.1.2. Kan Şekeri	62
3.1.3. Serum Lipid Düzeyleri	64

3.2. <i>In-vivo</i> Kalp Deneyleri	65
3.3. Papiller Kas Deneyleri	68
3.3.1. Fenoterol Aracılı Kasılma Yanıtı	69
3.3.2. Noradrenalin Aracılı Kasılma Yanıtı	70
3.3.3. Forskolin Aracılı Kasılma Yanıtı	71
3.4. Langendorff Perfüze Kalp Deneyleri	72
3.4.1. İzoprenalin Aracılı Kasılma Yanıtı	72
3.4.2. CL 316,243 Aracılı Gevşeme Yanıtı	73
3.5. Western Blot Deneyleri	74
3.5.1. SERCA2a İfadeleme Düzeyi	74
3.5.2. GRP78 İfadeleme Düzeyi	74
3.5.3. Fosfolamban ve Fosforile Fosfolamban İfadeleme Düzeyi	74
3.5.4. β_3 -Adrenerjik Reseptör İfadeleme Düzeyi	76
3.5.6. eNOS İfadeleme Düzeyi	76
4. TARTIŞMA	78
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
ÖZET	87
SUMMARY	88
KAYNAKLAR	89
EKLER	108
Ek.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay Kararı	108
ÖZGEÇMİŞ	110

ÖNSÖZ

Diabetes mellitus dünya çapında 460 milyondan fazla hastayı etkilemektedir ve bu hastalarda morbidite ve mortalitenin birincil nedeni kardiyovasküler komplikasyonlardır. Bu komplikasyonların ortaya çıkmasında beta adrenerjik reseptör yanıtverirliğindeki bozukluklar önemli rol oynamaktadır. Öte yandan, diabete bağlı kardiyovasküler komplikasyonların önlenmesi için ön koşul glisemik kontroldür. Sodyum glukoz kotransporter 2 inhibitörleri (SGLT2i), diğer antidiabetik ilaçlardan farklı olarak kardiyovasküler faydaları olduğu öne sürülen yeni bir antidiabetik ilaç sınıfıdır. SGLT2i'nin kardiyovasküler hastalıklara sahip diabetik hastalarda kardiyovasküler nedenlerden kaynaklanan ölüm oranını, tüm nedenlerden kaynaklı ölüm oranını ve kalp yetmezliği nedeniyle hastanede yatış oranını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. SGLT2i'nin bu sistemik olumlu etkileri hemodinamik etkiler ve metabolik etkiler ile açıklanmaya çalışılmıştır. Ne var ki, kardiyovasküler komplikasyonlar üzerine koruyucu etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Çalışmamızda, bu noktadan yola çıkarak, bir SGLT2i olan dapagliflozinin tip 2 diabetik sıçanlardaki kardiyovasküler komplikasyonlara etkisi beta adrenerjik reseptör yanıtları üzerinden incelenmiştir.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Lisans eğitiminin üçüncü yılında eczacılık meslek bilimlerine giriş yapmış ve dinlemekten büyük keyif aldığım farmakoloji dersleri ile birlikte çalışmak isteyeceğim alanın farmakoloji olduğuna karar vermiştim. Bu amaçla, dördüncü ve beşinci sınıfta Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan ve Doç. Dr. Işıl Özakça Gündüz'ün laboratuvar çalışmalarına katılabilme olanağı bulmuştum. Bu süreçte yaptığım deneyler ile farmakolojiye ilgim daha da artmıştı. Mezuniyetim yaklaşırken hocalarımın desteği ve yönlendirmeleri ile birlikte doktora eğitimine burada başlamaya karar verdim. Prof. Dr. V. Melih Altan hocamın beni öğrencisi olarak

kabul etmesi başıma gelecek en güzel şeylerden biriydi. Böylece, lisans mezuniyetim sonrası vakit kaybetmeden 2012 yılının Eylül ayında doktora eğitimine başladım. Eğitimin ilk iki yılı lisansüstü dersleri alarak, bir dönemini Erasmus programı ile Cardiff Üniversitesinde tamamlayarak, dahası laboratuvarımızdaki deneysel çalışmalarda yer alarak ve son olarak, doktora yeterlilik sınavına hazırlanarak geçti. Ardından zorlu bir süreç başladı. Diabetin tedavisinde SGLT2i'nin önemine çok erkenden dikkat çeken Prof. Dr. V. Melih Altan ve çalışmayı detaylandıran Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan hocamın yardımları ve önerileriyle tez konumu belirledik. Sonrasında, tez projesinin kabulü ile birlikte yoğun deney günleri başladı. Bu süreçte hem fiziksel hem de mental olarak yorgunluklarım oldu. Bu sürecin kolay, hızlı geçen ve sadece akademik gelişme sağlayan bir süreç olmadığını; sabır, dikkat ve sıkı çalışma gerektiren ve ayrıca kişiliğimin çok yönlü gelişmesine olanak sağlayan bir yol olduğunu zamanla anladım. Bu süreci, başta hocalarımla ve arkadaşlarımla yardımları ve destekleri olmadan tamamlayamazdım.

Lisans eğitimim sırasında beni kabul ederek araştırmalarına dâhil eden ve o günden bugüne kadar bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bir ekip olarak çalışmanın inceliklerini öğreterek huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan, sadece akademik alanda olmayıp aynı zamanda hayatın her alanında bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan'a,

Lisanstayken derslerini dinlemekten büyük keyif aldığım, emekliliğine yaklaşırken benim doktora danışmanım olmayı büyük bir incelikle kabul eden, danışmanım olduğu süre boyunca bilgi birikimi, tecrübesi, anlayışı ve entelektüel kişiliği ile birçok konuda benim gelişimime katkı sağlayan ve hayat enerjisini örnek aldığım değerli hocam Prof. V. Melih Altan'a,

Doktora eğitimim boyunca, çalışmalarımı titizlikle inceleyen, gerek teorik gerek pratik deneysel bilgisini paylaşarak çalışmalarına katkıda bulunan sayın hocam Prof. Dr. A. Tanju Özçelikay'a,

Eğitimim süresince desteğini esirgemeyen ve zarifliği ile bana örnek olan anabilim dalı başkanımız, sayın hocam Prof. Dr. Arzu Onay Beşikci'ye,

Çalışmalarım boyunca, anlayışlarını ve desteklerini esirgemeyen farmakoloji anabilim dalı değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Nuray Arı, Prof. Dr. Gülgün Ozansoy ve Prof. Dr. Serap Gür'e,

Beraber çalışma olanağı bulduğum, bu süreçte ve sonrasında tecrübesi ve bilgilerini benimle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Işıl Özakça Gündüz'e,

Tecrübesini ve bilgisini benimle paylaşan, eğitimim boyunca desteğini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Gizem Kaykı Mutlu'ya,

Çalışmalarımın her aşamasında bana eşlik eden; uzun, zorlu deney süreçlerini organize, hatasız ve bir o kadar eğlenceli geçirmemi sağlayan; beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Ecz. Betül R. Erdoğan, Uzm. Ecz. A. Elif Müderrisoğlu ve Ecz. Z. Elif Yeşilyurt'a,

Tecrübelerini benimle paylaşan, gerektiğinde deneylerime yardımlarını esirgemeyen, ortak eğitim süreci içerisinde dayanışma sağladığımız sevgili arkadaşlarım Dr. Berna Güven, Dr. Didem Yılmaz Oral, Dr. Aysu Selçuk, Dr. Ceren Uyar Boztaş, Ecz. Zümra Kara ve Ecz. Nihal Öztürk'e,

Öğrencilik işlerimin sorunsuz bir şekilde yürümesini sağlayan anabilim dalı sekreterimiz Sayın Fatma Cerepoğlu'na,

Çalışmalarımdaki hayvan bakımı ve bazı deneysel uygulamalardaki yardımları ile işlerimi kolaylaştıran Sayın İsmail Başer'e,

Preklinik çalışmaların dizaynı, yürütülmesi, verilerin istatistiksel analizi gibi birçok konudaki engin bilgisi ile çalışmalarıma katkılarda bulunan Prof. Dr. Martin C. Michel'e,

Doktora tezim için gerekli olan biyokimya testlerini yapan Adana Devlet Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı Biyokimya Uzmanı Dr. Nadir Duman'a, laboratuvar personeline ve Detya Lab. Cihaz Sanayi A.ř.'ye,

Doktora eğitimim boyunca sağladıkları proje desteği nedeniyle Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne (16L0237006) ve TÜBİTAK'a (SBAG-115S564),

Manevi desteği ile bu süreci tamamlamama yardım eden sevgilim Can'a,

Ve elbette bu süreçte sevgisi, güveni ve desteği ile hep yanımda olan sevgili Aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AC	Adenilat siklaz
ACM	Herhangi bir sebeple ölüm
ADA	Amerikan Diabet Derneği
AR	Adrenerjik reseptör
ATP	Adenozin trifosfat
β	Beta
BA	Beden ağırlığı
BCA	Bikinkoninik asit
BSA	Bovine serum albümin
CA	Kanada
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CH	İsviçre
CN	Çin Halk Cumhuriyeti
CO	Kardiyak debi
CVOT	<i>Cardiovascular outcome trial</i>
CZ	Çekya
D	Diabetik grup
DBP	Diastolik kan basıncı
DE	Almanya
DKA	Diabetik ketoasidozis
DKM	Diabetik kardiyomiyopati
DM	Diabetes mellitus
dP/dt_{\max} (+dP/dt)	Kasılma hızı
dP/dt_{\min} (-dP/dt)	Gevşeme hızı
DPP-4i	Dipeptidil peptidaz 4 inhibitörü
DT	Dapagliflozin tedavili diabetik grup
DTT	Ditiyotretol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>

EDP	Diastol sonu kan basıncı
EDPVR	Diastol sonu basınç-hacim ilişkisi eğimi
EDV	Diastol sonu hacmi
EDVI	Diastol sonu hacim indeksi
eGFR	Glomerüler filtrasyon hızı
EF	Ejeksiyon fraksiyonu
EMA	Avrupa İlaç Kurumu
E _{max}	Maksimum yanıt
eNOS	Endotelial nitrit oksit sentaz
ER	Endoplazmik retikulum
ERS	Endoplazmik retikulum stresi
ES	İspanya
ESP	Sistol sonu kan basıncı
ESPVR	Sistol sonu basınç-hacim ilişkisi eğimi
ESV	Sistol sonu hacmi
ESVI	Sistol sonu hacim indeksi
F	Fransa
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FG	Fourneir gangreni
GC	Guanilat siklaz
G α _i	İnhibitör nitelikteki G proteini
GD	Gestasyonel diabet
GLP-1 RA	Glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonisti
GPCR	G proteini kenetli reseptör
GRP78	Glukoz regüle protein 78
G α _s	Stimülatör etkinlikteki G proteini
HbA _{1c}	Glukozillenmiş hemoglobin A
HDL-C	Yüksek dansiteli lipid kolesterol
HFD	Yüksek yağ diyeti
HFpEF	Ejeksiyon fraksiyonu korunmuş kalp yetmezliği
HFrEF	Ejeksiyon fraksiyonu azalmış kalp yetmezliği
HHF	Kalp yetmezliğine bağlı hastaneye yatış

HR	Kap atım hızı
I	İtalya
i.p.	<i>Intraperitonal</i>
IDF	Uluslararası Diabet Federasyonu
K	Kontrol grubu
KA	Kalp ağırlığı
KBH	Kronik böbrek hastalığı
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
KP	Güney Kore
KŞ	Kan şekeri
KT	Dapagliflozin tedavili kontrol grubu
KV	Kardiyovasküler
KVH	Kardiyovasküler hastalıklar
KVK	Kardiyovasküler komplikasyonlar
KY	Kalp yetmezliği
LDL-C	Düşük dansiteli lipid kolesterol
LV	Sol ventrikül
LVDP	Sol ventrikül pik basıncı
LVEDP	Sol ventrikül diastol sonu basıncı
LVEF	Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu
LVH	Sol ventrikül hipertrofisi
J	Japonya
μ	Mikro
MACE	Majör advers kardiyak olay
MAP	Ortalama kan basıncı
MI	Miyokard infarktüsü
NA/NE	Noradrenalin
NOS	Nitrik oksit sentaz
NS	Nitroselüloz membran
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
ORT	Ortalama
PDE2	Fosfodiesteraz

p-eNOS	Fosforile endotelial nitrit oksit sentaz
PI3K	PhosphoInositol-3-Kinase
PIC	Protein inhibitör kokteyl
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PLN	Fosfolamban
p-PLN	Fosforile fosfolamban
PRSW	Önyük bağımsız kalbin atım gücü
PV	Basınç-hacim
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> membran
RI	Endonezya
RIPA	<i>Radioimmuneprecipitation assay</i>
SBP	Sistolik kan basıncı
SD	Standart sapma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SERCA2a	Sarkoplazmik retikulum Ca^{++} ATPaz
SGLT	Sodyum glukoz kotransportu
SGLT1	Sodyum glukoz kotransport 1
SGLT2	Sodyum glukoz kotransport 2
SGLT2i	Sodyum glukoz kotransport 2 inhibitörü
SR	Sarkoplazmik retikulum
STZ	Streptozotosin
SÜ	Sülfonilüreler
SV	Kalp atım hacmi
SVI	Kalp atım hacim indeksi
T	Portekiz
T1D	Tip 1 diabet
T2D	Tip 2 diabet
Tau	İzovolumik gevşeme sabiti
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline-Tween
TG	Trigliserid

TGS	Tris-Glisin-SDS
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TM	Transmembran
TR	Türkiye
TZD	Tiazolidindionlar
UACR	Urin albüminin kreatinine oranı
USA	Amerika Birleşik Devletleri
USD	Amerikan doları
UK	Birleşik Krallık
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Tip 2 diabette glukoz düşürücü tedavi: genel bakış	11
Şekil 1.2. Böbreklerdeki SGLT2 ve SGLT1'in glukoz reabsorpsiyonundaki rolü ve SGLT2 inhibisyonu	14
Şekil 1.3. Böbreklerde glukoz reabsorpsiyonu ve SGLT2 inhibisyonu	15
Şekil 1.4. Adrenoseptör tipleri	21
Şekil 1.5. β 2-AR'nin şematik diyagramı	23
Şekil 1.6. β 1-AR yapısının gökkuşağı renginde şerit gösterimi	24
Şekil 1.7. β 1 ve β 2-AR'ün hücre içi sinyal transdüksiyon yolağı	27
Şekil 1.8. PLN/Serca aktivitesinin düzenlenmesinde β adrenerjik agonist uyarımı	28
Şekil 1.9. PLN'nin modellenmesi	28
Şekil 1.10. Kardiyomiyositlerde β 3-AR sinyal aktivasyonunun şematik gösterimi	29
Şekil 1.11. Sağlıklı ve zayıf kalp kasında inotropik olarak zıt etki gösteren β - AR'lerin hipotetik rolü	31
Şekil 3.1. Sıçanların beden ve kalp ağırlıkları değerlerine ait grafikler	61
Şekil 3.2. Sıçanların kan şekeri değerlerine ait grafikler	62
Şekil 3.3. OGTT kan şekeri değerlerinin zamana göre değişim grafiğı	63
Şekil 3.4. Sıçanların serum lipid değerlerine ait grafikler	64
Şekil 3.5. Sıçanların kan basınçlarının karşılaştırmalı grafikleri	65
Şekil 3.6. <i>In-vivo</i> sistolik fonksiyon parametrelerine ait grafikler	66
Şekil 3.7. <i>In vivo</i> diastolik fonksiyon parametrelerine ait grafikler	66
Şekil 3.8. Papiller kasta fenoterol aracılı kasılma yanıtı	69
Şekil 3.9. Fenoterol doz yanıtı kontrol grubu örnek görüntüsü	69
Şekil 3.10. Papiller kasta noradrenalin aracılı kasılma yanıtı	70
Şekil 3.11. Noradrenalin doz yanıtı kontrol grubu örnek görüntüsü	70
Şekil 3.12. Papiller kasta forskolin aracılı kasılma yanıtı	71
Şekil 3.13. Forskolin doz yanıtı kontrol grubu örnek görüntüsü	71
Şekil 3.14. Langendorff perfüze kalp sisteminde izoprenalin aracılı kasılma yanıtı	72
Şekil 3.15. İzoprenalin doz yanıtı kontrol grubu örnek görüntüsü	72
Şekil 3.16. Langendorff perfüze kalp sisteminde CL316,243 aracılı gevşeme yanıtı	73

Şekil 3.17. CL 316,243 doz yanıt kontrol tedavili grup örnek görüntüsü	73
Şekil 3.18. Kalpte pozitif inotropi ile ilişkili protein ifadeleri	75
Şekil 3.19. Kalpte pozitif inotropi ile ilişkili protein ifadelerinde gruplara ilişkin örnek sinyaller	76
Şekil 3.20. Kalpte negatif inotropi ile ilişkili protein ifadeleri	77
Şekil 3.21. Kalpte negatif inotropi ile ilişkili protein ifadelerinde gruplara ilişkin örnek sinyaller	77



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Sıçanların normal yem bileşenleri listesi	41
Çizelge 2.2. Sıçanların yüksek yağlı yem bileşenleri listesi	42
Çizelge 2.3. Krebs çözültüsü formülü (Krebs-Hensleit <i>Solution</i>)	46
Çizelge 2.4. Örnek yükleme tamponu formülleri	50
Çizelge 2.5. Numunelerin hazırlanması için gerekli lizat, steril su ve örnek tamponu miktarları	51
Çizelge 2.6. Numunelerin hazırlanması için gerekli lizat, steril su ve örnek tamponu miktarları	52
Çizelge 2.7. Jel formülü	54
Çizelge 2.8. Trisin jel formülü	54
Çizelge 2.9. Katot tamponu formülü	54
Çizelge 2.10. Anot tamponu formülü	55
Çizelge 2.11. Transfer tamponu formülü	56
Çizelge 2.12. Primer antikorlar ve dilüsyonları	57
Çizelge 2.13. Sekonder antikorlar ve dilüsyonları	57
Çizelge 3.1. Sıçanların deney günü ölçülen beden ağırlığı ve kan şekeri değerleri	61
Çizelge 3.2. Oral glukoz tolerans testi ile elde edilen kan şekeri değerleri	63
Çizelge 3.3. Sıçanların serum lipid değerleri	64
Çizelge 3.4. <i>In-vivo</i> bazal kardiyak hemodinamik parametreler	67
Çizelge 3.5. Önyük bağımsız <i>in-vivo</i> kardiyak parametreler	68

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

Diabet yüksek kan şekeri düzeyi (hiperglisemi) ile karakterize kronik ve ilerleyici bir hastalıktır (ADA, 2014). Diabetin oluşmasında birçok patolojik süreç rol oynamaktadır. Pankreasın beta (β) hücrelerindeki otoimmün kaynaklı hasar insülin eksikliğine yol açmaktadır. Buna ek olarak; karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklar nedeniyle insülinin hedef dokularda kullanılamaması sonucunda insülin direnci meydana gelmektedir (ADA, 2014).

Diabetin semptomları poliüri (aşırı idrara çıkma), polidipsi (aşırı susama), kilo kaybı, bazen polifaji (aşırı yeme), bulanık görme/görme bozukluğu, ayaklarda uyuşma, karıncalanma ve yanma, idrar yolu/ mantar enfeksiyonları ve yorgunluktur (ADA, 2014; TÜRKDİAB, 2018 ve WHO, 2016).

1.1.1. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

Diabet tip 1 diabet (T1D), tip 2 diabet (T2D), gestasyonel diabet (GD) ve özel nedenlere bağlı diabet olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (ADA, 2010). Toplumda %87-91 oran ile en fazla görülen diabet tipi T2D olup %7-12 oranında T1D ve %1-2 oranında diğer diabet tipleri görülmektedir (Ogurtsova ve ark., 2017).

1.1.1.1. Tip 1 Diabet

İnsülin bağımlı diabet veya ergenlik başlangıçlı diabet olarak da adlandırılan bu diabet çoğunlukla mutlak insülin eksikliğine yol açan β hücre hasarına bağlıdır (ADA, 2018). Bu hastalar kan şekeri regülasyonu için düzenli olarak günlük insüline ihtiyaç duyarlar.

Tip 1 diabet iki tipe ayrılmaktadır. Birincisi immün kaynaklı T1D olup tüm T1D olgularının %95'ini teşkil eder (TÜRKDİAB, 2018). Pankreasın insülin salınımından sorumlu β hücrelerindeki otoimmün hasardan kaynaklı hücre harabiyeti ve insülin kaybı ile sonuçlanmaktadır (ADA, 2018 ve Levitt ve ark., 2011). İkincisi ise, idiopatik T1D'tir. Bazı T1D formlarının etiyojisi bilinmemektedir. Bu hastalarda kalıcı insülinopeni olmasına karşın β hücrelerde otoimmüniteye dair bir kanıt rastlanmamıştır. Görülme sıklığı düşüktür (%5) (TÜRKDİAB, 2018) ve çoğunluğu Afrika veya Asya kökenli kişilerden oluşmaktadır (ADA, 2018).

1.1.1.2. Tip 2 Diabet

İnsüline bağımlı olmayan diabet ya da erişkin başlangıçlı diabet olarak da adlandırılan bu diabet tipi tüm diabet hastalarının %87-91'ini oluşturmakta olup en sık görülen diabet tipidir. Hastalığın sebebi tam olarak bilinmemektedir. Pankreasta otoimmüniteye bağlı bir hasara rastlanmamış olup genellikle bağıl insülin eksikliği kaynaklıdır (ADA, 2018). Pankreas hasarının veya insülin reseptör duyarlılığının azalmasına bağlı oluşan insülin eksikliği veya insülin direncinin neden olduğu insülin yetersizliği T2D'in patogeneğinde rol almaktadır (Dhalla ve ark., 2014).

Bu tip diabet hastalarının büyük bir çoğunluğunun aşırı kilolu ya da obez olduğu görülmektedir (ADA, 2018). Bu hastalarda, hedef dokularda (karaciğer, kas, yağ dokusu, miyokard) görülen insülin direnci belirgin bir özelliktir. Obezitenin sonucu olarak insülin duyarlılığındaki azalma ile pankreatik beta hücreleri insülin

miktarını arttırmak için fazla insülin üretimine zorlanır. β hücreleri bir süre sonra bu isteği yerine getiremeyecek bir noktaya ulaşır, insülin üretilemez ve kan şekeri düzeyi kontrol edilemediği için artar (Inzucchi ve ark., 2012 ve Levitt ve ark., 2011).

1.1.1.3. Gestasyonel Diabet

Gestasyonel diabet (GD) ilk olarak hamilelik sırasında farkedilen glukoz intoleransı olarak tanımlanmıştır. Çoğu vaka doğum sonrası düzelmekle birlikte, bu tanım hastalığın hamilelikten sonra da devam edip etmediği veya hamilelik öncesinde tanımlanmamış glukoz toleransı ihtimali göz ardı edilerek tüm vakalar için kullanılmıştır (ADA, 2014). Tüm gebeliklerin yaklaşık %7'sinde GD tanısı konulmaktadır ve yıllık 200.000'den fazla vaka ile sonuçlanmaktadır (ADA, 2014). 2017 yılında yaklaşık 21,3 milyon canlı doğumun (%16,2) hamilelikteki bir çeşit hiperglisemiden etkilendiği tahmin edilmektedir. Bu vakaların yaklaşık 18,4 milyonu, gebelikteki tüm hiperglisemi vakalarının %86,4'ünü oluşturan GD'ye bağlı olduğu; diğer vakaların ise hamilelikten önce tespit edilen diabet (%6,2) ve hamilelikte tespit edilen diğer diabet tipleri (%7,4) olduğu belirtilmiştir (Cho ve ark., 2018). Bu nedenle, GD tanısı konan kadınlarda prediabet veya T2D gelişiminin önlenmesi için ömür boyu takip edilmeleri gerekmektedir (ADA, 2018).

1.1.1.4. Özel Nedenlere Bağlı Diabet

Diabet hastalığı bazı özel durumlardan kaynaklanabilmektedir. Bu durumlar şu şekilde sınıflandırılmıştır (ADA, 2014 ve TÜRKDİAB, 2018).

- Pankreatik β hücrelerin genetik hasarı (*Maturity-onset diabetes*),
- İnsülin etkisindeki genetik hasar (A tipi insülin rezistansı, *leprechaunism*, Rabson-Mendenhall sendromu, lipoatrofik diabet),
- Ekzokrin pankreas hastalıkları (pankreatit, travma/pankreotektomi, neoplazi, kistik fibrozis, hemokromatozis, fibrokalkülöz pankreatopati),

- Endokrinopatiler (akromegali, Cushing sendromu, glukagonoma, feokromasitoma, hipertiroidizm, somatostatinoma, aldosteronoma),
- İlaç veya kimyasal maddeler (vakor (PNU), pentamidin, nikotinik asit, glukokortikoidler, tiroid hormonları, diazoksid, beta adrenerjik agonistler, tiazid diüretikler, antipsikotik ilaçlar, dilantin, statinler, gama interferon),
- İnfeksiyonlar (konjenital kızamıkçık, sitomegalovirüs, koksaki B, kabakulak, adenovirüsler),
- Bazı yaygın olmayan immün kaynaklı hastalıklar (Stiff-man sendromu, anti-insülin reseptör antikoları)
- Diabet ile ilişkili/birlikte görülebilen diğer genetik hastalıklar (Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu, Wolfram sendromu, Friedreich ataksisi, Huntington koresi, Laurence-Moon-Biedl sendromu, Myotonik distrofi, porphyria, Prader-Willi sendromu).

1.1.2. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi

Günümüzde diabet en sık rastlanan hastalıklardan biri haline gelmiştir (Bugger ve Abel, 2014) ve neden olduğu sorunlar nedeniyle toplum sağlığı açısından önemi daha da artmaktadır. Diabetin görülme sıklığı ekonomik ilerlemedeki gelişme, yaşam süresinde uzama beklentisi, şehirleşmenin neden olduğu fiziksel aktivitedeki azalma, yaşam tarzının neden olduğu obezite artışı (Whiting ve ark., 2011) ve yaşlanma (Wild ve ark., 2004) gibi risk faktörlerine bağlı olarak her geçen gün artmaktadır. Bunlara ek olarak, demografik yapının değişmesi (nüfusun artışı) ve daha iyi sağlık hizmetleri/bakım uygulamaları nedeniyle diabetik insan yaşam süresinin uzaması diabetin görülme sıklığını arttıran faktörlerdir (Whiting ve ark., 2011).

Diabetin görülme sıklığının hesaplandığı birçok çalışmada diabet tiplerini birbirinden ayrı değerlendirmek pek mümkün olmamıştır. Bu nedenle çoğu raporda beraber değerlendirilmişlerdir (Cho ve ark., 2018). 1964 yılında dünyada 30 milyon diabet hastası olduğu belirtilirken, 1980 yılında 108 milyon insanın diabet hastası

olduğu bildirilmiştir (WHO, 2016). Uluslararası Diabet Federasyonu (IDF)'nin yayımlamış olduğu raporlara göre 2000 yılında diabetik kişi sayısının tahmini 151 milyon olduğu bildirilirken, geçtiğimiz 2019 yılında bu sayının 463 milyon (%9,3) olduğu bildirilmiştir (IDF, 2000 ve IDF, 2019). 2030 yılında bu sayının 578,4 milyona, 2045 yılında ise 700,2 milyona ulaşması beklenmektedir.

Dünya genelindeki artış ile aynı doğrultuda Türkiye'de de diabetin görülme sıklığının arttığı görülmektedir. 1998 yılında Türkiye'de diabet görülme oranı %13,7 (yeni %32,3; bilinen %67,7) (Satman ve ark., 2002) iken 2010 yılında bu oran %16,5 (yeni %45,5; bilinen %54,5)'e yükselmiştir (Satman ve ark., 2013). Öte yandan, 2019 yılı verilerine baktığımızda diabetin Türkiye'de görülme oranının %11,1'e (6,6 milyon) gerilediği görülmektedir (IDF, 2019). Ne var ki, Avrupa lkeleri arasında en yüksek diabet görülme sıklığı Türkiye'ye aittir.

Diabet hastalığına bağlı ölüm sayıları da oldukça fazladır. Diabeti olmayan insanlarla karşılaştırıldığında T2D'li bireylerde, diabetin ölümleri %15 oranında arttırdığı gösterilmiştir. Bu oran gençlerde (55 yaş altı ve HbA_{1C}'si %6,9 (55mmol/mol) olan insanlarda) iki kat daha fazladır (Chatterjee ve ark., 2017). 2017 yılında 20-79 yaş arası 4,1 milyon insan diabet nedeniyle ölmüştür (IDF, 2017) ki bu da her 1 saniyede 8 ölümün olduğu anlamına gelmektedir. 20-99 yaş arasında ise 5 milyon insan diabet nedeniyle ölmüş olup ölümlerin üçte birinden fazlası (%36,5; 1,8 milyon) 60 yaş altı diabetik insanlarda görülmüştür (Cho ve ark., 2018).

Kronik bir hastalık olan diabetin sağlık üzerindeki etkilerinin yanında ekonomik etkileri de bulunmaktadır. Diabetin hem bireye hem de ülkelere maliyeti oldukça fazladır. Dünya genelinde diabet için yapılan harcamaların büyük çoğunluğu hastane ve ayakta bakım yapılan hastalar içindir (WHO, 2016). Küresel sağlık harcamalarının %12'sini diabet harcamaları oluşturmaktadır.

2007 yılında diabet için yapılan küresel sağlık harcamaları toplamının 232 milyar Amerikan Doları (USD) bulacağı düşünülürken (IDF, 2006), 2019 yılında 20-

79 yaş arası diabetik hastalar için yapılan harcamalar tahmini 760 milyar USD olmuştur (IDF, 2019). 2007 yılındaki verilerle karşılaştırıldığında, 2019 yılındaki 20-79 yaş arası diabetik hastalar için yapılan sağlık harcamalarının %328 oranında arttığı görülmektedir. Diabetin ekonomik etkisinin artmaya devam etmesi beklenmektedir. Harcamaların 2030 itibariyle 825 milyar USD, 2045 itibariyle 845 milyar USD'ye ulaşacağı öngörülmektedir (IDF, 2019).

2019 (IDF) verilerine göre, Avrupa bölgesinde diabet için yapılan toplam sağlık harcamaları tahmini 161,4 milyar olup, bu harcamalardaki en büyük pay %23,8 ile Türkiye'ye aittir.

Düşük ve orta gelir düzeyine sahip ülkelerde diabetin prevalansı yüksek gelir düzeyine sahip ülkelere göre çok daha yüksektir (Whiting ve ark., 2011). Diabet nedeniyle fazla olan sağlık harcamaları halihazırda ekonomisi kötü olan ülkelerde ekonomiye daha fazla yük olmaktadır. Ekonomik etkileri ile paralel olarak, diabet bu ülkelerin kalkınması ve sosyal yaşamını (Ogurtsova ve ark., 2017) olumsuz etkilemektedir.

1.1.3. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diabet, kronik hiperglisemi nedeniyle birçok ciddi komplikasyona neden olmaktadır. Diabet iki büyük vasküler komplikasyon ile ilişkilendirilmiştir. Diabetin aorta, femoral ve koroner arterler gibi büyük arterleri etkilemesiyle makrovasküler komplikasyonlar; göz, böbrek ve nöron kapillerleri gibi küçük kan damarlarını etkilemesiyle mikrovasküler komplikasyonlar oluşmaktadır (Blair, 2016 ve Gray ve Jandeleit-Dahm, 2014).

Makrovasküler komplikasyonlar; genellikle ateroskleroz, hipertansiyon, diabetik kardiyomiyopati (DKM), kalp yetmezliği (KY), miyokard infarktüsü (MI), inme ve amputasyon ile sonuçlanan kardiyovasküler (KV) ve periferik damar

hastalıklarını kapsamaktadır (Gray ve Jandeleit-Dahm, 2014; Huynh ve ark., 2014 ve Moura ve ark., 2014). Diabetik mikrovasküler komplikasyonlar ise diabetik triopati olarak adlandırılmış olup retinopati, nefropati ve nöropatiyi kapsamaktadır (Carrillo-Sepulveda ve ark., 2014).

1.1.3.1. Diabetik Kardiyovasküler Komplikasyonlar

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) T2D'nin en önemli komplikasyonlarından biridir. Kardiyovasküler komplikasyonlar (KVK), mikrovasküler komplikasyonlardan 2-6 kat daha fazla görülmektedir (Duckworth, 2001). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2013 yılı verilerine göre, diabeti olan kişilerde KVH görülme sıklığı %26 ile %36 arasında değişmektedir. (Shah ve ark., 2015) yapmış olduğu bir çalışma sonucunda; T2D'te KVH'ın en sık görülen ilk belirtilerinin KY ve periferik arter hastalığı olduğu belirtilmiştir. Buna ek olarak, KVH diabetik kişilerde morbidite ve mortalitenin birincil nedeni sayılmaktadır (Huynh ve ark., 2014). Diabetik hastaların %60'ının ölümü KVH nedeniyle olmakla birlikte (Duckworth, 2001), ölüm nedenleri sıralamasında koroner arter hastalığı ve inme en başta gelmektedir (Einarson ve ark., 2018).

EURIKA çalışmasına göre, Türkiye'de KVH'a sahip kişilerde diabet görülme sıklığının %31,4; EUROASPIRE III Türkiye verilerine göre, bu oranın %33,6 olduğu bildirilmiştir (Abacı, 2011). TEKHARF ve TURDEP çalışmasında T2D ile ilişkilendirilen KVH sıklığında artış gösterilmiştir (Bayindir ve ark., 2015).

Diabette KVK'ların gelişiminde etkili potansiyel mekanizmalar; hipergliseminin ötesinde kardiyak yapı ve kalp fonksiyonunu olumsuz etkileyebilecek çoklu faktörlerin etkileşimi ile açıklanmaktadır.

Diabetik miyokardın belirgin bir özelliği kardiyak hipertrofi ve fibrozdur (Huynh ve ark., 2014). Kardiyomiyosit hipertrofisi, miyokardiyal fibroz,

kardiyomiyosit apopitoz ve oksidatif stres gelişimine fonksiyon bozuklukları eşlik edebilmektedir (Tan ve ark., 2020). Diabet hem sistolik hem de diastolik fonksiyonu etkilemektedir (Bando ve Murohara, 2014; Fang ve ark., 2004; Tan ve ark., 2020). Diabetik hayvanlarda yapılan çalışmalarda sol ventrikülün kasılma ve gevşemesinde yavaşlama, kalbin kasılabilirliği, kardiyak debi ve atım gücünde azalma olduğu bildirilmiştir (Sellers ve Chess-Williams, 2001).

Diabet aynı zamanda hücre içi kalsiyum salıverilmesini, miyokardiyal lipid metabolizmasını ve endotel hücre fonksiyonunu etkilemektedir (Dei Cas ve ark., 2015). Bununla birlikte, diabet kontraktile, regülatör protein ifadenmesi ve kardiyomiyositteki Ca^{++} duyarlılığındaki anormallikler ile ilişkilendirilmektedir (Dei Cas ve ark., 2015). Buna ek olarak, sarkoplazmik (endoplazmik) retikulum Ca^{++} ATPaz 2 (SERCA2a) aktivitesinin hiperglisemili ortamda inkübe edilmiş kardiyomiyositlerde oksidatif stres ile inaktive edildiği bulunmuştur. Ayrıca, sarkoplazmatik retikulumda Ca^{++} 'nin sekanslanması sonucu sitosolde Ca^{++} 'nin aşırı yüklenmesine ve gevşeme yanıtının bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir. Ca^{++} homeostazındaki bu bozulmalar, miyofibriler yeniden şekillenme (remodeling) ile ilişkilidir ve diastolik fonksiyon bozukluğunun klinik bulguları ile ilişkilendirilmiştir (Dei Cas ve ark., 2015).

Diabete bağlı olarak gelişen kardiyak disfonksiyon nedeninin artan membran geçirgenliği, miyokardiyal metabolizmadaki dengesizlik ve kardiyomiyositlerdeki yapı değişimi ile ilişkili olabilmesinin (Dhalla ve ark., 2014) yanı sıra diabetle kalp/damarlardaki β -AR'lerin ifadelerinin değişmesi ile de ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Dincer ve ark., 2001).

1.1.4. Diabetes Mellitus'un Tedavisi

Amerikan Diabet Derneği (ADA) ve Avrupa Diabet Araştırmaları Birliğinin (EASD) yetişkinlerde T2D yönetimi ile ilgili 2018 yılı raporuna göre, T2D tedavisinin hedefleri komplikasyonları önlemek veya geciktirmek ve yaşam kalitesini korumaktır (Davies ve ark., 2018a ve Davies ve ark., 2018b). Bunun için öncelikle, yaşam tarzı değişikliği ve kişinin öz diabet yönetimi ve desteğine odaklanması önerilmektedir. Obezitesi olan hastalar için yaşam tarzı değişikliği, ilaç ve cerrahi müdahaleler dâhil olmak üzere kilo kaybını hedefleyen yöntemler önerilmektedir. İlaç tedavisi ile ilgili olarak, diabet hastalığına eşlik eden bir kardiyovasküler hastalığı veya böbrek hastalığı olup olmama durumuna göre çeşitli tedavi seçenekleri önerilmektedir (Şekil 1.1).

T2D tedavisinde birçok oral ve injekte edilebilir ilaç kullanılmaktadır. Bu ilaçlar birbirinden farklı mekanizmalar ile kan şekerini düşürmektedirler. Sülfonilüreler (SÜ) ve glinidler insülin salgılanmasını uyararak, metformin ve tiazolidindionlar (TZD) insülin duyarlılığını arttırarak etkisini göstermektedir. Bununla birlikte, glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri (GLP-1 RA) ve dipeptidil peptidaz-4 inhibitörleri (DDP-4i) inkretin yolağını aktive edip insülin sekresyonunu uyararak kan şekerini düşürmektedir. Son olarak, sodyum glukoz kotransport 2 inhibitörleri (SGLT2i) böbreklerde glukozun reabsorbsiyonunu inhibe edip glukozun atılımını arttırarak kan şekerini düşürmektedir.

Bugüne kadar diabetin farmakolojik tedavisi çoğunlukla hiperglisemi kontrolü üzerine yoğunlaşmıştır. Diabetin vasküler komplikasyonlarla ilişkisi nedeniyle son zamanlarda, sadece kan şekerini düşürmeye odaklanmak yerine, kardiyovasküler fonksiyonların korunması üzerinde de durulmaya başlanmıştır (DeFronzo ve ark., 2012 ve Schalkwijk ve Stehouwer, 2005). Son yıllarda, iki yeni grup antihiperglisemik ilaç grubunun, kan şekeri düşürücü etkinliğinin kardiyovasküler hastalıkları önleyici potansiyeline ek olarak, hipoglisemik etkilerden bağımsız bir şekilde kardiyoprotektif olabilecekleri düşünülmekteydi. Bu ilaç

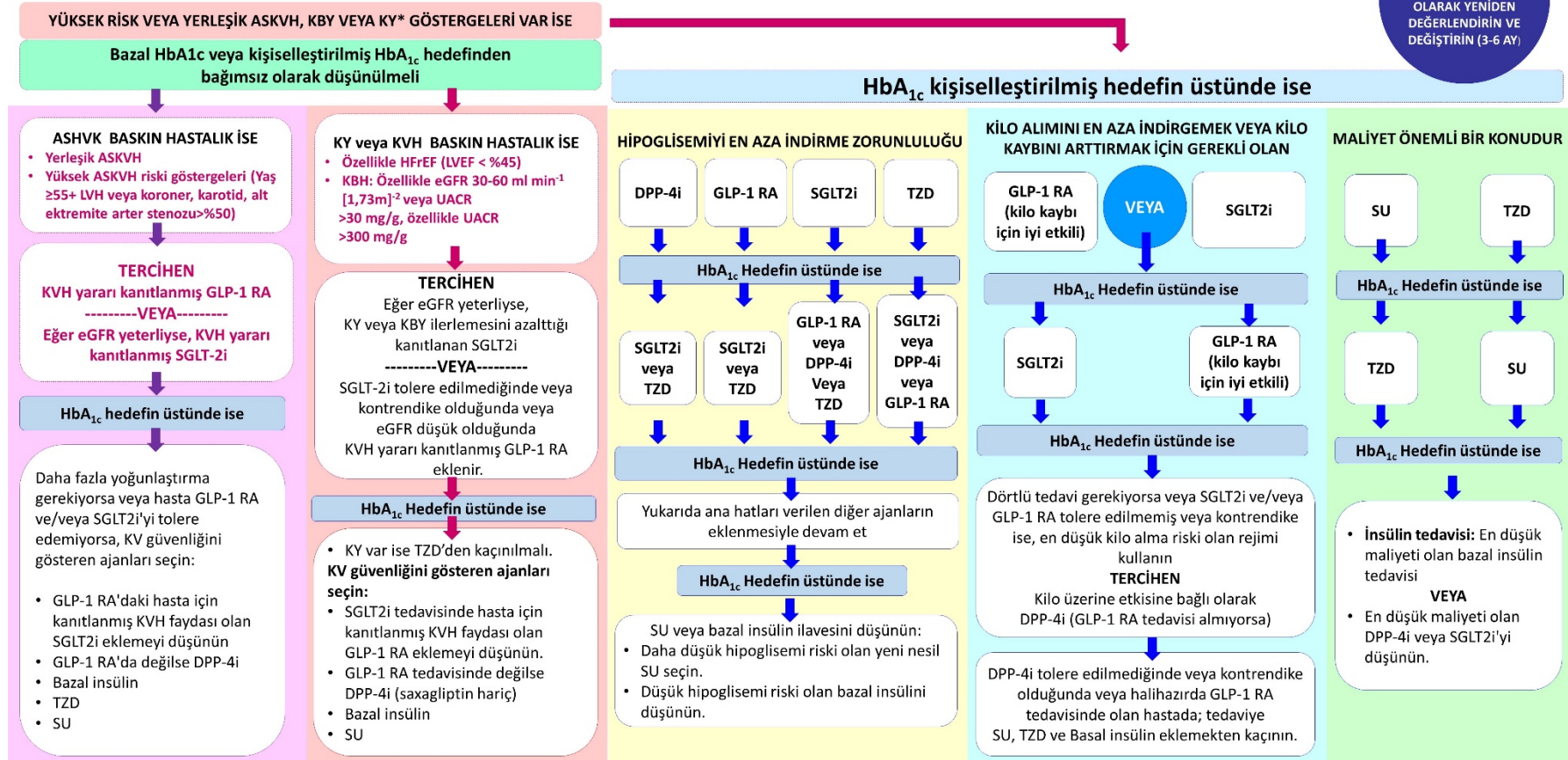
gruplarından biri inkretin etkili ilaçlar (GLP-1RA ve DDP-4i), diğeri ise SGLT2i'dir. Her iki grup ilaç da kan şekerini etkin şekilde düşürmekte ve düşük hipoglisemi riski göstermektedir. Buna ek olarak, kan basıncı, vücut kütlesi ve kardiyovasküler hastalıkların gelişmesine neden olan metabolik yollar üzerinde yararlı etkileri gösterilmiştir (Jayawardene ve ark., 2014). Bunlarla beraber, son yıllarda yayınlanan büyük ölçekli kardiyovasküler sonuç çalışmalarının (Kato ve ark., 2019; McMurray ve ark., 2019a; Radholm ve ark., 2018 ve Zinman ve ark., 2015) önemli bulguları ile diabetin yönetiminde bu ilaç gruplarının önemi daha iyi anlaşılmıştır.



TİP 2 DİABETTE GLUKOZ DÜŞÜRÜCÜ TEDAVİ: GENEL YAKLAŞIM

BİRİNCİ BASAMAK TEDAVİ METFORMİNDİR VE KAPSAMLI YAŞAM TARZIDIR (KİLO YÖNETİMİ VE FİZİKSEL AKTİVİTE DAHİL)

KLİNİK ATALETİ
ÖNLEMELİK İÇİN
TEDAVİYİ DÜZENLİ
OLARAK YENİDEN
DEĞERLENDİRİN VE
DEĞİŞTİRİN (3-6 AY)



Şekil 1.1. Tip 2 diabette glukoz düşürücü tedavi: genel bakış (Buse ve ark., 2020) American Diabetes Association and European Association for the Study of Diabetes, 2019.

DPP-4i, dipeptid peptidaz 4 inhibitörü; GLP-1 RA, glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonisti; SGLT2i, sodyum glukoz kotransport 2 inhibitörü; SU, sulfonilüre; TZD, tiazolidonlar; ASHKV; Aterosklerozaya bağlı kardiyovasküler hastalık; HFrEF; Ejeksiyon fraksiyonu azalmış kalp yetmezliği; eGFR; Glomerüler filtrasyon hızı; KBH; kronik böbrek hastalığı, KVH; kardiyovasküler hastalık; KY; kalp yetmezliği, LVEF; sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu; LVH, sol ventrikül hipertrofi; UACR, Urine albümin/kreatinin oranı. ©

1.1.5. Sodyum Glukoz Kotransport 2 İnhibitörleri

Sodyum glukoz kotransport 2 (SGLT2) inhibisyonu, diabet tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmış olsa da; aslında SGLT2 inhibisyonu, 130 yıl önce Belçikalı ve Fransız bilim insanları tarafından ortaya konulmuştur (Jorgens, 2019). 1835 yılında Laurent-Guillaume de Koninck ve Jean Servais Stas isimli Fransız kimyagerler elma ağaçlarının kabuğundan *phlorizin* adını verdikleri bir glikozid izole etmişlerdir (Ehrenkranz ve ark., 2005 ve Jorgens, 2019). Bundan 50 yıl sonra, Prof. Freiherr von Mering, *phlorizin*'in köpeklerde glisemiyi azalttığını ve “böbrekte bir şeyi değiştirerek glukozüriyi indükleyebileceğini” varsaydığını bildirmiştir. Bir yıl sonra ise, diabetli kişilerde *phlorizin*'in (15-20 g) glukozüriyi %6-8 indüklediğini bildirmiştir (Jorgens, 2019)

Sodyum glukoz kotransportların (SGLT) karakterizasyonu (Bölüm 1.1.5.1'e bakınız) ve hipergliseminin azaltılması için potansiyel yeni bir mekanizmanın gerçekleştirilmesi ile eşzamanlı olarak 1980'lerin sonlarından 1990'ların başına kadar *phlorizin*'e ilgi yeniden ortaya çıkmıştır (White, 2010). Diabette kan şekeri seviyesi ve insülin direnci üzerine olumlu etkilerine karşın (Abdul-Ghani ve DeFronzo, 2008 ve Rossetti ve ark., 1987), *phlorizin* diabet tedavisi için kullanılan bir ilaç olmamıştır. Gastrointestinal sistemden emiliminin az olması ve spesifik olmayan SGLT inhibisyonu nedeniyle bu problemleri aşan analoglar geliştirilmiştir (White, 2010).

Şu anda, T2D'nin tedavisi için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Kurumu (EMA) tarafından onaylanmış dört adet Sodyum glukoz kotransport 2 inhibitörü (SGLT2i) (kanagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin ve ertugliflozin) bulunmaktadır. Bunların haricinde Japonya (Poole ve Dungo, 2014) ve Güney Kore'de (Shestakova ve ark., 2018) onaylanmış ipragliflozin bulunmaktadır. Ülkemizde ise Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanan iki adet SGLT2i (dapagliflozin ve empagliflozin) bulunmaktadır. Bu

ilaçlar monoterapi olarak veya diğer glukoz düşürücü ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılabilir.

1.1.5.1. Sodyum Glukoz Kotransport 2 İnhibitörlerinin Etki Mekanizması

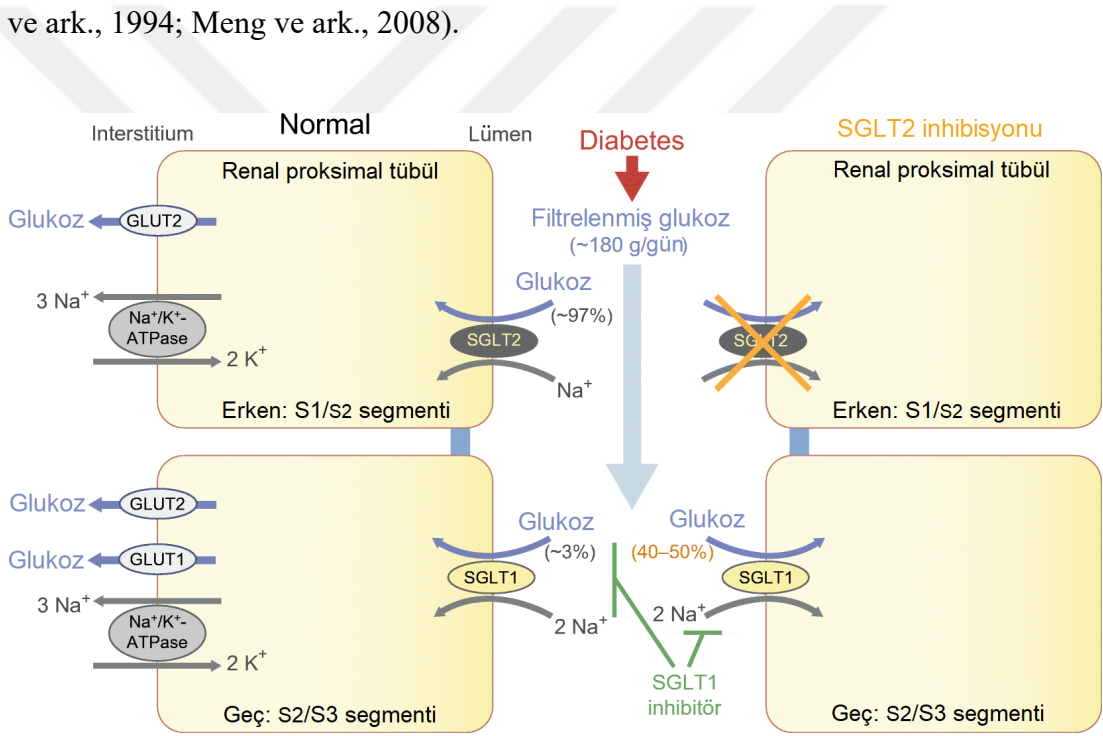
İnsan vücudunda glukoz homeostazı karaciğer, kas, adipozitler, pankreas, nöroendokrin sistem ve böbrekler ile sağlanmaktadır (DeFronzo ve ark., 2012). Yüzyıllar boyunca, böbrek öncelikle bir eleme organı ve tuz-iyon dengesinin düzenleyicisi bir organ olarak kabul edilmiş ve glukoz homeostazındaki rolü göz ardı edilmiştir. Şimdi ise glukoz regülasyonu arenasında önemli bir oyuncu olarak kabul edilmektedir (White, 2010).

Böbreğin glukoz homeostazındaki rolü ilk kez 1930 yılında tanımlanmıştır (Gerich, 2010). Böbrekler; glukoz tüketimi, glukoneogenesis ile glukoz üretimi ve glukoz reabsorpsiyonu (geri emilimi) olmak üzere üç farklı mekanizma ile glukoz homeostazisine katkı sağlamaktadır (Jayawardene ve ark., 2014 ve Vivian, 2014). Tüm bu mekanizmalar diabetik kişilerde değişebilmektedir (Gerich, 2010).

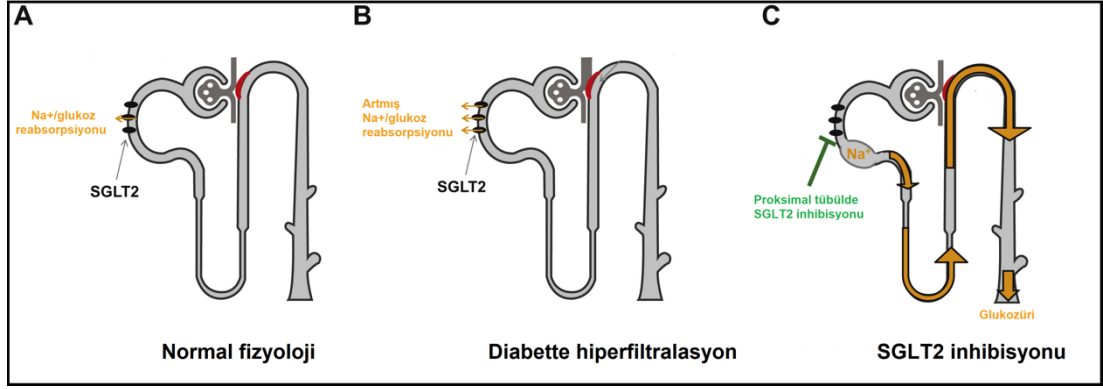
Sağlıklı bir kişide normal şartlar altında, böbrek tübüllerinde filtrelenen glukozun hemen hemen hepsi, %1'i idrarla atılacak şekilde yeniden emilir (Han ve ark., 2008; Meng ve ark., 2008). Filtrelenen glukoz, böbrek tübüllerinin maksimum glukoz reabsorpsiyon kapasitesini (TmG; yaklaşık olarak 375 mg/dk [425 g/gün]) aşınca glukoz üre ile atılmaktadır (Şekil 1.3). Kapasite aşılmadığı zamanlar ise glukozüri minimal düzeydedir (Wilding, 2014). Glomerülden filtrelenen glukozun reabsorpsiyonu, lümen tübül yüzeyindeki SGLT'ler tarafından aktif taşıma ve bazolateral membrandaki sodyum-bağımsız glukoz taşıyıcı 2 (GLUT2)'ler tarafından kolaylaştırılmış difüzyon kombinasyonu ile olmaktadır. Konsantrasyon gradyanına karşı glukoz transferinin konsantrasyon gradyanından Na⁺ transferi ile birleştirilmesi, işlemi enerjik olarak uygun hale getirir. Bu transfer için gerekli endotel hücresi

(*interstitium*) içindeki düşük Na^+ konsantrasyon önkoşulu, Na^+/K^+ ATPaz pompaları tarafından sağlanır (Washburn, 2009) (Şekil 1.2).

İki adet böbrek sodyum glukoz transportu (taşıyıcı) tanımlanmıştır. Sodyum glukoz kotransportu 1 (SGLT1), proksimal tübül S3 segmentinde yer alan düşük kapasite ve yüksek afinitiyeye sahip bir proteindir. Böbrekler dışında barsakta ve kalpte bulunmaktadır (Inzucchi ve ark., 2015). SGLT2 ise proksimal tübül S1 segmentinde bulunan yüksek kapasite ve düşük affiniteli bir proteindir (Foote ve ark., 2012). Böbreklerden glukoz reabsorpsiyonu büyük ölçüde (yaklaşık %90'ı) SGLT2 tarafından yapılırken kalan %10 reabsorpsiyona SGLT1'ler aracılık etmektedir (Kanai ve ark., 1994; Meng ve ark., 2008).



Şekil 1.2. Böbreklerdeki SGLT2 ve SGLT1'in glukoz reabsorpsiyonundaki rolü ve SGLT2 inhibisyonu (Rieg ve Vallon, 2018).



Şekil 1.3. Böbreklerde glukoz reabsorpsiyonu ve SGLT2 inhibisyonu (Wanner, 2017).

SGLT2i'ler diabetik kişilerde artan kan şekeri düzeylerini azaltmak amacıyla geliştirilmiştir (Bhartia ve ark., 2011). SGLT2'ye affinitesi SGLT1'den 1400 kat fazla olan ve oral olarak kullanılabilen bir SGLT2i olan dapagliflozin (Wilding, 2014), üriner glukoz atılımını artırarak T2D hastalarında kan şekeri düzeylerini hipoglisemi riski olmadan düşürmektedir (Ptaszynska ve ark., 2013). Klinik çalışmalarda, dapagliflozinin monoterapi olarak kullanıldığında, açlık kan şekeri 0,8-3,6 mmol/l düşürdüğü gösterilmiştir (Ferrannini ve ark., 2010 ve Fonseca ve ark., 2013).

Dapagliflozin, ilk olarak 2012'de Avrupa'da, T2D'li yetişkinler için, diyet ve egzersizin tek başına yetersiz kaldığı, metformine karşı toleranssız hastalarda veya diğer kan şekeri düşürücü ajanlarla yeterli glisemik kontrol sağlamadığı durumlarda monoterapi olarak veya kombinasyon tedavisi olarak onaylanmıştır. Başlangıçta böbrek fonksiyonuna bağlı etki mekanizması nedeniyle, dapagliflozin kullanımı, glomerüler filtrasyon hızı (eGFR) > 60ml/dk/1,73m² olan hastalarla ve daha yaşlı hastalarda sınırlı denemeler nedeniyle, 75 yaşın altındaki hastalarla sınırlandırılmıştır (Wilding ve ark., 2017). Sonrasında, kronik böbrek yetmezliği (KBY) veya kronik böbrek hastalığı (KBH) olan T2D hastalarında yapılan çalışmanın (Fioretto ve ark., 2018) olumlu sonuçları ile eGFR'si 45-59 ml/dk/1,73 m² olan hastalarda da kullanımı onaylanmıştır. Bunun dışında, eGFR'si 25-75ml/dk/1,73m² olan böbrek hastalarının dâhil olduğu DAPA-CKD (*A Study to Evaluate the Effect of Dapagliflozin on Renal Outcomes and Cardiovascular Mortality in Patients With Chronic Disease*) adlı bir çalışma devam etmektedir (McMurray ve ark., 2019a).

1.1.5.2. Sodyum Glukoz Kotransport 2 İnhibitörlerinin Kardiyovasküler Etkileri

SGLT2i çoklu etkileri olan antihiperlisemik ilaç grubudur. Antihiperlisemik etkilerinin yanı sıra kalp basıncı, lipid profili ve beden ağırlığı üzerine de faydalı etkileri bulunmaktadır.

Bir SGLT2i olan dapagliflozinin plazma açlık kan şekeri, HbA_{1C}, kan basıncı ve plazma lipid düzeylerini düşürdüğü ve vücut kütleini azalttığı gösterilmiştir (McGurnaghan ve ark., 2019; Phrommintikul ve ark., 2019; Rizzo ve ark., 2015 ve Wilding ve ark., 2017). Ayrıca, SGLT2i kullanan T2D hastalarında orta düzeyde kilo kaybı olduğu gösterilmiştir. Bu etkiye, idrarla glukoz kaybı sonucu kalori kaybının ve glukozürinin ozmotik diüretik etkisinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Monoterapi ve kombine tedavide kilo kaybı 1-4 kg olarak bildirilmiştir (Bailey ve ark., 2010 ve Ferrannini ve ark., 2010). Bu grup ilaçların, hafif ozmotik diüretik etkisi ile sistolik kan basıncını 3-9 mmHg düşürdüğü gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, kilo kaybı ve sodyum atım artışının, kan basıncı azalmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Bailey ve ark., 2010). Öte yandan, bazı çalışmalarda SGLT2i'lerin total kolesterol ve yüksek dansiteli lipid kolesterol (HDL-C) üzerine faydalı etkileri olduğu bildirilmiştir. Dapagliflozin ile tedavi edilen hastalarda HDL-C'de %1,8-%4,4 artış; trigliserid düzeylerinde ise %2,4-%6,2 düşme saptanmıştır (Control ve ark., 2009). Ayrıca, SGLT2i'lerin ürik asit düzeyinde 0,05 mmol/l civarında bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Henry ve ark., 2012). Buna bağlı olarak bu ilaç grubunun, kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olan artmış serum ürik asit düzeyini düşürerek kardiyovasküler sistem üzerine faydalı etkilerinin olabileceğini düşünülmektedir (Zoppini ve ark., 2009).

Bununla birlikte, SGLT2 inhibisyonunun glukozüri, diürez, kilo kaybı ve kan basıncında azalma gibi etkileri aracılığıyla kalp yetmezliği olan hastalarda kalbin iş yükünü azaltacağı, ayrıca bozulmuş ventriküler fonksiyon ve remodeling için de yararlı olabileceği düşünülmektedir. SGLT2 inhibisyonunun sıçanlarda kalp yetmezliği modelinde artan sol ventrikül kütlesi ve sol ventrikül diastol sonu çapını

azalttığı bildirilmiştir (Inzucchi ve ark., 2015). Diabetik hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, SGLT2i empagliflozin tedavisinin diabet ile bozulan endotel fonksiyonları iyileştirdiği, aortada oksidatif stresi azalttığı (Oelze ve ark., 2014) ve diabetteki kardiyovasküler remodelingi düzelttiği bulunmuştur (Lin ve ark., 2014).

İlerleyen yıllarda yapılan büyük çaplı klinik araştırmalar ile daha önceki çalışmalarda elde edilen bulguları destekler nitelikte önemli sonuçlar alınmıştır. EMPA-REG OUTCOME (Empagliflozin *Cardiovascular Outcome*) çalışmasında, empagliflozin alan T2D hastalarında kalp yetmezliğine bağlı hastaneye yatış (HFF) (%35), KV nedenlerden ölüm (%38) ve herhangi bir sebeple ölüm (ACM) oranı (%32) plasebo alan hastalara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Zinman ve ark., 2015). Empagliflozinin olumsuz KV olay riskini azaltmadaki bu yararlı etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bununla beraber, SGLT2i'lerin böbrek koruma mekanizmalarına ilişkin (Wanner, 2017) kalp fizyolojisi değişikliği (Pham ve Chilton, 2017), hemodinamik, metabolik veya hormonal etkiler (Perreault, 2017) dâhil olmak üzere çeşitli potansiyel mekanizmalar önerilmiştir. Yakın zamanda yapılan EMPA-HEART çalışması, tedaviye SGLT2i ilavesinin kardiyak olaylarda yararlı olduğunu, özellikle KY ile güçlü bir ilişkisi olan sol ventrikül kitlesini azalttığını göstermiştir (Verma ve ark., 2019).

Bir başka SGLT2i ile yapılan CANVAS (Canagliflozin *Cardiovascular Assessment Study Program*) çalışmasının ilk sonuçlarına göre kanagliflozin ile tedavi edilen hastalarda, plasebo alanlara göre daha düşük majör advers kardiyak olay (MACE: ACM, MI veya inme) riski tespit edilmiştir (Neal ve ark., 2017). Aynı çalışmanın devamında, kanagliflozinin T2D hastalarında KV ölüm riski ve HFF'yi azalttığı bulunmuştur (Radholm ve ark., 2018).

DECLARE-TIMI 58 (Dapagliflozin *Effect on CardiovascuLAR Events: Thrombolysis in Myocardial Infarction 58*) klinik araştırmasında, SGLT2i dapagliflozinin T2D hastalarının geniş bir popülasyonunda KV ölüm oranını azalttığı ve HFF'yi (%27) önemli derecede düşürdüğü gösterilmiştir (Wiviott ve ark., 2019). Daha önceden geçirilmiş MI öyküsü olan T2D hastalarında MACE ve KV

ölüm/HHF riski daha yüksektir. Dapagliflozinin bu hastalarda her iki riski önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Furtado ve ark., 2019). Bununla birlikte, dapagliflozinin bazal sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu üzerindeki yararının araştırılması için yapılan başka bir çalışmada, dapagliflozinin ejeksiyon fraksiyonu azalmış kalp yetmezliği (HFrEF) olan T2D hastalarında HHF, KV ölüm ve ACM'yi düşürdüğü, HFrEF olmayan T2D hastalarında ise sadece HHF'yi düşürdüğü gösterilmiştir (Kato ve ark., 2019). Diabetin varlığına bakılmaksızın sadece kalp yetmezliğinin incelendiği DAPA-HF (*Dapagliflozin And Prevention of Adverse-outcomes in Heart Failure*) çalışmasında, HFrEF olan hastalarda kalp yetmezliğinin kötüleşme riski veya kardiyovasküler neden kaynaklı ölüm riski dapagliflozin alan hastalarda plasebo alan hastalara göre düşük bulunmuştur (McMurray ve ark., 2019b). Bu çalışmayla eş zamanlı başlayan ve henüz sonuçlanmayan DELIVER (*Dapagliflozin Evaluation to improve the LIVEs of patients with pReserved ejection fraction heart failure*) adlı klinik çalışmada ejeksiyon fraksiyonu korunmuş kalp yetmezliği (HFpEF) olan hastalarda dapagliflozinin morbidite ve mortalite üzerine etkisi incelenmektedir (McMurray ve ark., 2019a). DAPA-HF ve DELIVER çalışmaları, SGLT2i'lerin kalp yetmezliğinin önlenmesini büyük ölçüde incelemiş olan diğer denemelerden farklı olarak, her iki ana fenotipte iyi karakterize edilmiş kalp yetmezliği olan hastalar için güvenli ve etkili bir tedavi olup olmadığının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (McMurray ve ark., 2019a).

1.1.5.3. Sodyum Glukoz Kotransport 2 İnhibitorlerinin Yan Etkileri

SGLT2i'lerin en yaygın yan etkileri, idrarda glukoz atımı nedeniyle orta dereceli ve kolay tedavi edilebilen üriner ve genital sistem enfeksiyonudur (Desouza ve ark., 2015 ve Jabbour ve ark., 2018). İnsülin salgılanmasından bağımsız şekilde kan şekeri düzeyini düşürdükleri için hipoglisemi riski çok düşüktür. SÜ, TZD ya da insülin gibi hipoglisemi yapan ilaçlar ile kombinasyon tedavilerinde de hipoglisemide bir artış görülmemiştir (Halimi ve Verges, 2014).

Tüm SGLT2i'lerin kullanımında ürtiker, kaşıntı, ışığa duyarlılık ve çeşitli döküntülerin eşlik ettiği birçok vaka ile deri toksisitesi bildirilmiştir. İlaçlardaki aromatik halka varlığı, “açıl glukuronid” metaboliti oluşumu ile birlikte hipersensitivite reaksiyonlarına neden olduğu düşünülmektedir (Raschi ve ark., 2017). Bununla birlikte, diabetik ketoasidozis ile ilgili vakalar bildirilmiş olsa da bu vakaların önemli bir kısmının T1D hastalarında endikasyon dışı kullanım ile ilgili olduğu (TİTCK, 2016) ve T2D hastalarında T1D hastalarına göre ortalama olarak daha az şiddetli olduğunu belirtilmiştir (Bonora ve ark., 2018).

Kanagliflozin esas olarak ayak parmağı veya metatarsal düzeyinde olmak üzere yüksek amputasyon riski ile ilişkilendirilirken (Neal ve ark., 2017), dapagliflozin ile yapılan çalışmada, amputasyon olayı bildirilmemiştir (Fioretto ve ark., 2018).

SGLT2 inhibisyonun kemik üzerinde olumsuz etkilere yol açtığı varsayılan serum fosfat seviyelerini artırma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (Taylor ve ark., 2015); ancak, dapagliflozin (Fioretto ve ark., 2018), kanagliflozin (Qiu ve ark., 2017) ve empagliflozinin kırılma riskini arttırmadığı gösterilmiştir. Dahası, kalsiyum, inorganik fosfor ve 25-hidroksivitamin D gibi kemik minerallerinde dapagliflozin kullanımında anlamlı bir değişiklik bildirilmemiştir (Ljunggren ve ark., 2012).

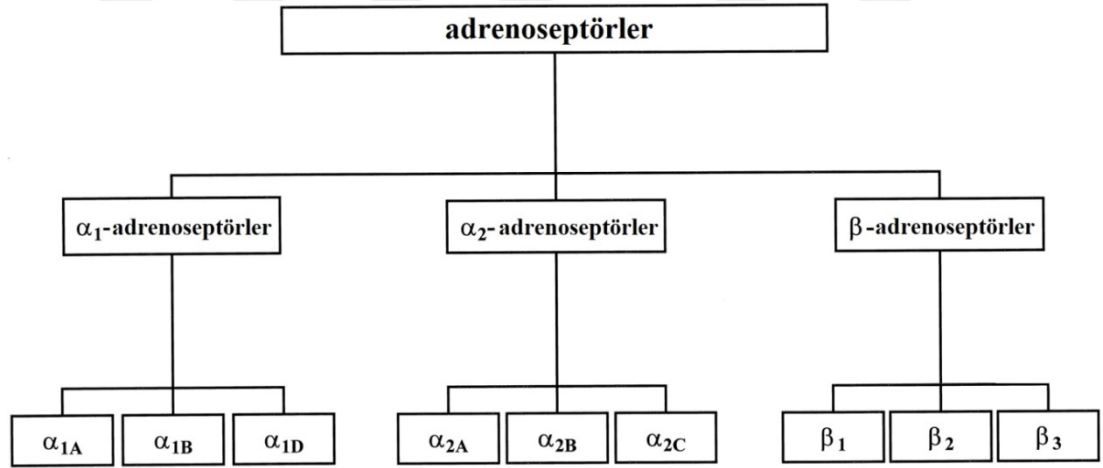
Dapagliflozin kullanımına bağlı mesane kanseri (Ptaszynska ve ark., 2015) ve meme kanseri (Lin ve Tseng, 2014) vakaları bildirilmiştir. Ancak, az sayıda kanser vakasının olması ve prelinik çalışmalarda dapagliflozinin kanserojen potansiyelinin bulunmaması (Billger ve ark., 2019), dapagliflozin ile artmış mesane kanseri riski arasındaki nedensel ilişkiyi desteklememektedir. Bununla birlikte, insanlarda dapagliflozin ile kanser arasındaki ilişkinin önceden var olan kanserin erken teşhisinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Lin ve Tseng, 2014).

Son zamanlarda SGLT2i kullanıma bağlı olarak bildiren en ciddi yan etki *fournier gangreni* (FG) olmuştur (Bersoff-Matcha ve ark., 2019). FG; dış genital, perineal ve perianal bölgeyi etkileyen; akut, hızlı ilerleyen ve potansiyel olarak ölümcül olan infektif nekrotizan fasiittir (Smith ve ark., 1998). Diabetes mellitus, FG gelişimi için bir risk faktörü olmasına rağmen, raporlanan vakaların bazılarının muhtemelen SGLT2i kullanımı ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili sağlık otoriteleri (EMA, 2019; FDA, 2018 ve TİTCK, 2019) tarafından hekimlere ve SGLT2i kullanan hastalara dikkat uyarıları yapılmıştır.

1.2. Beta Adrenerjik Reseptörler

Adrenerjik reseptörler (AR), bir başka deyişle adreseptörler, noradrenalin (norepinefrin) ve adrenalinin (epinefrin) merkezi ve periferik etkilerine aracılık eden reseptörlerdir. Adreseptörler hemen hemen tüm periferik dokularda ve merkezi sinir sistemi içindeki birçok nöronal popülasyonda bulunmaktadır. Hem noradrenalin hem de adrenalinin kan basıncının, miyokardiyal kasılma hızının ve kuvvetinin, solunum yolu reaktivitesinin ve çeşitli metabolik ve merkezi sinir sistemi fonksiyonlarının kontrolünde önemli rol oynamaktadır.

1948'de, adreseptörler ilk önce farmakolojik özelliklerine (agonistlerin potens sırasına) dayanarak alfa (α) ve beta (β) olmak üzere iki ana tipe ayrılmıştır (Ahlquist, 1948). Daha sonra hem farmakolojik hem de moleküler kanıtlara dayanarak, her biri üç alt tipe bölünmüş üç ana tip (α_1 , α_2 ve β) belirlenmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Adreseptör tipleri (Brodde ve Michel, 1999) ve (Katrin ve ark., 2019)'dan uyarlanmıştır.

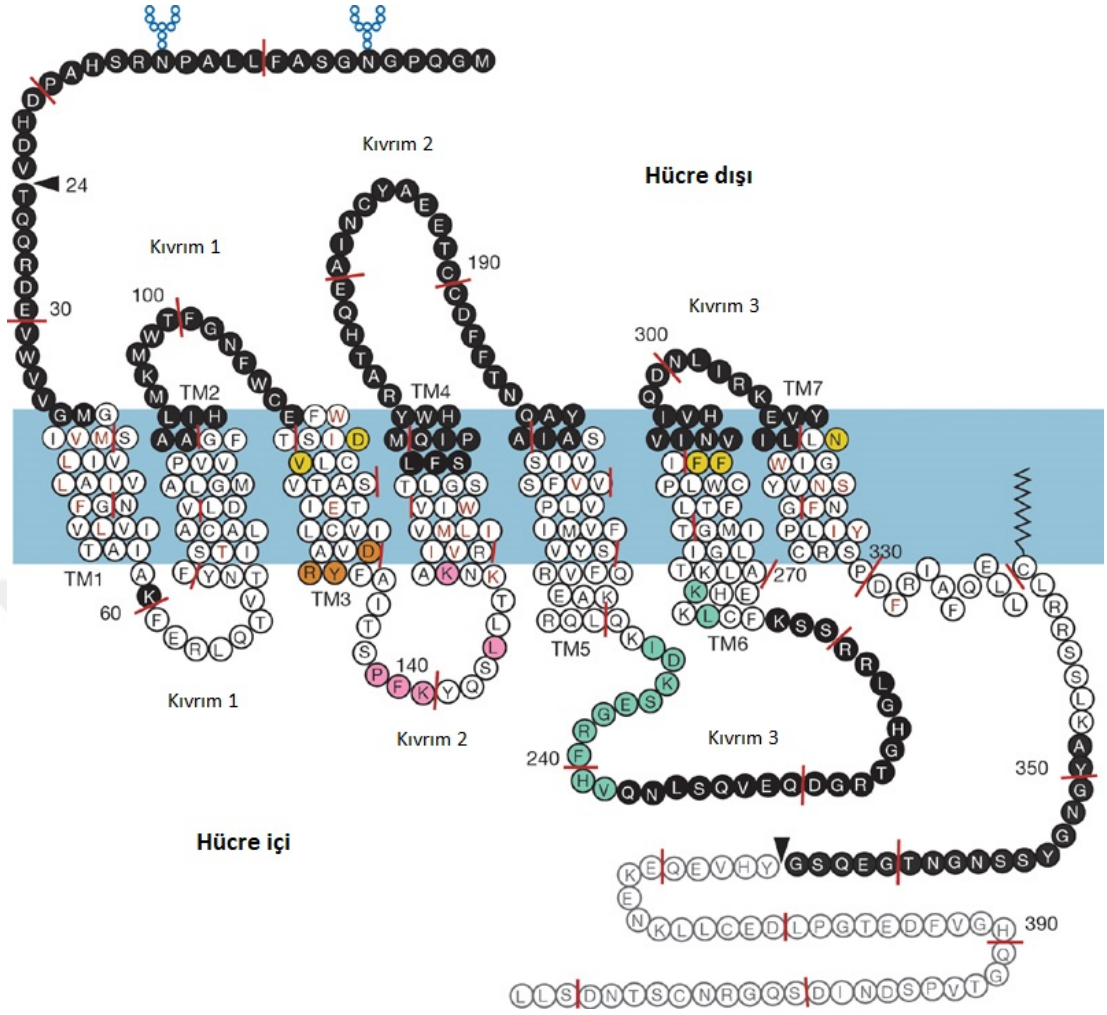
1.2.1. Beta Adrenerjik Reseptör Alt Tipleri

İlk olarak, 1967'de, β -AR'lerin agonistlere verdiği cevabı Ahlquist'e benzer şekilde karşılaştıran Land ve arkadaşları (1967), β -AR'lerin iki alt tipinin olduğu sonucuna vardılar. Buna göre; noradrenalin ve adrenaline karşı aynı derecede duyarlı olan reseptör β_1 -AR; noradrenaline karşı daha az duyarlı olan β_2 -AR olarak sınıflandırılmıştır (Katrin ve ark., 2019 ve Lands ve ark., 1967). Daha sonra yapılan çalışmalar ile β -AR aracılı cevapların hepsinin β_1 - veya β_2 -AR olarak sınıflandırılmayacağı, ek bir β -AR alt tipinin daha var olduğunu anlaşılmıştır (Arch ve ark., 1984 ve Bond ve Clarke, 1988). Yaygın olarak kullanılan β -AR antagonistlerine duyarsız olan bu reseptör β_3 -AR olup genellikle "atipik" β -AR olarak adlandırılmaktadır. Buna ek olarak, farmakolojik kanıtlar ile çeşitli türlerin kardiyak dokularında lokalize dördüncü bir β -AR olabileceği üzerinde durulmuş olsa da (Kaumann, 1997) bu reseptörün β_1 -AR'nin düşük afiniteli bölgesi olduğu anlaşılmıştır (Kaumann ve ark., 2001).

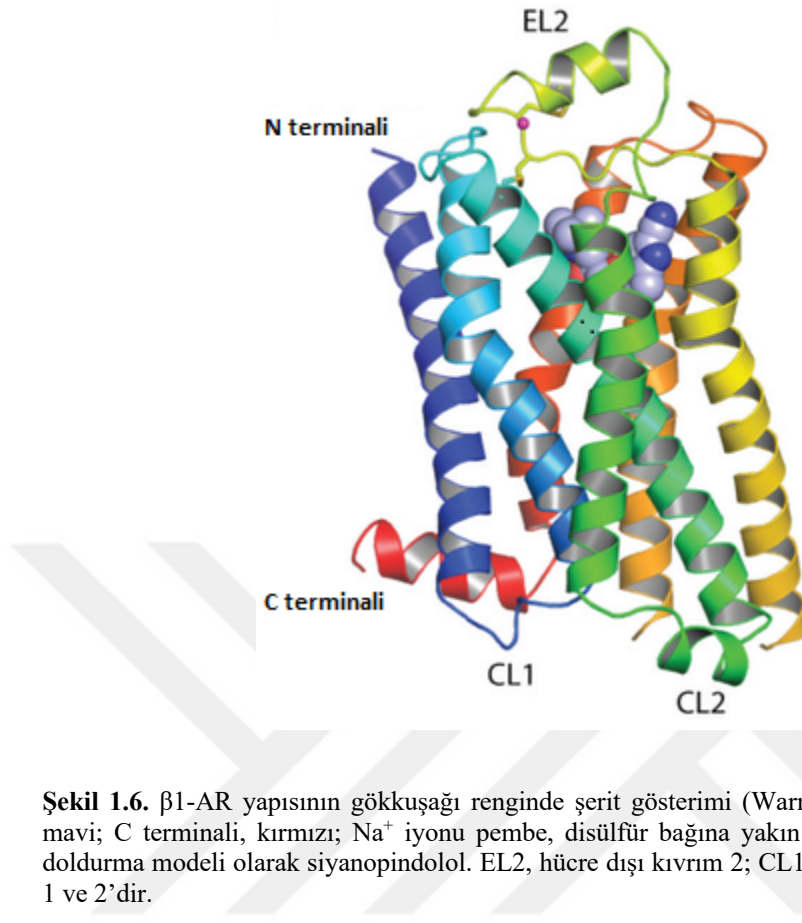
β -AR alt tipleri belirgin bir şekilde farklı doku dağılımlarına sahiptir. β_1 -AR esas olarak kalpte ifadelenirken; β_2 -AR uterus, iskelet kası ve akciğerlerde; β_3 -AR ise başlıca adipoz doku ve mesanede olmak üzere birçok doku ve organda ifadelenmektedir (Coman ve ark., 2009).

1.2.2. Beta Adrenerjik Reseptörlerin Yapısal Özellikleri

Beta adrenoseptörler G proteini kenetli protein (*G-protein couple reseptor-GPCR*) ailesinden olup, üç hücre içi ve üç hücre dışı kıvrım içeren yedi adet transmembran (TM) bölgeye sahiptirler (Şekil 1.5) (Rasmussen ve ark., 2007). N-terminali (uç) hücre dışındadır ve glikozile edilir, C-terminali ise hücre içindeki son bölgedir (Şekil 1.6). β_1 ve β_2 -AR arasındaki yapısal homoloji %54, β_3 - ve β_1 -AR arasında %51 ve β_2 - ve β_3 -AR arasında %46'dır (Nahmias ve ark., 1991).



Şekil 1.5. β_2 -AR'nin şematik diyagramı (Rasmussen ve ark., 2007). Beyaz harfli siyah daireler modele dahil olmayan düzensiz amino asitleri gösterir. Gri harfli daireler, kristalografi için kullanılan β_2 -AR 365 yapısında bulunmayan amino asitleri gösterir. Kırmızı harfler, yan zincir elektron yoğunluğunun modellenmediği amino asitleri gösterir. Sarı daireler, mutajenez çalışmalarından ligand bağlanmasında rol oynayan amino asitleri gösterir. Turuncu amino asitler korunmuş *DRY* sekansını gösterir. Yeşil amino asitler Fab5 epitopunu oluşturur ve pembe amino asitler kıvrımdaki Fab5 sabit alanına karşı yoğunlaşmıştır. Küçük mavi daireler glukozilasyon bölgelerini gösterir. Kırmızı çizgiler onluk amino asit artışlarını gösterir.



Şekil 1.6. β_1 -AR yapısının gökkuşağı renginde şerit gösterimi (Warne ve ark., 2008). N terminali, mavi; C terminali, kırmızı; Na^+ iyonu pembe, disülfür bağına yakın olan iki tanesi sarı ve boşluk doldurma modeli olarak siyanopindolol. EL2, hücre dışı kıvrım 2; CL1 ve CL2, sitoplazmik kıvrımlar 1 ve 2'dir.

Yakın zamanda, insan β_2 -AR yapısı X-ışını kristalografisi ile aydınlatılmıştır (Şekil 1.5) (Cherezov ve ark., 2007 ve Rasmussen ve ark., 2007). Bu, 7-TM reseptörlere ait kristal yapısının çözüldüğü ilk örnek olması ve diğer 7-TM reseptörlerinin homoloji modelleri için bir şablon olması açısından önem taşımaktadır (Katrın ve ark., 2019). İnsan β_1 -AR'nin kristal yapısı ise daha sonra yayınlanmıştır (Warne ve ark., 2008)

1.2.3. Beta Adrenerjik Reseptörlerin Kardiyak Fonksiyonlardaki Rolü

Kardiyovasküler sistem fonksiyonları sempatik ve parasempatik sinir sistemi tarafından düzenlenmektedir (Barbier ve ark., 2007). Sempatik sinir sistemi kalbin kasılabilirliği, kalp atım hızı ve kardiyak debiyi noradrenalin ve adrenalin aracılığıyla düzenlemektedir. Sempatik sinir uçlarından salınan noradrenalin, GPCR

ailesinden olan α - ve β -AR'lere adrenerjik reseptörlere bağlanmaktadır (Brodde, 1993). Klasik olarak, kalp hücrelerinde katekolamin stimülasyonunun sinyal iletimi esasen β_1 - ve β_2 -AR, daha az ölçüde ise α_1 -AR'ye atfedilmiştir. β_1 -AR'ler kalpteki β -AR'lerin çoğunluğunu oluşturduğu için kardiyak performansın düzenlenmesinde daha önemli role sahip iken, β_2 -AR daha sınırlı fonksiyona sahiptir (Dzimiri, 1999). β_1 - ve β_2 -AR'lerin kalpte pozitif inotropik, kronotropik ve lusitropik etkileri vardır. Yakın zamana kadar β -AR aktivasyonu, sadece kardiyak kasılma uyarımı ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık, Gauthier ve arkadaşlarının (1996) yapmış olduğu bir çalışma bu paradigmayı değiştirmiştir. β_1 ve β_2 -AR'lerin aksine, β_3 -AR'ler kalpte negatif inotropik etkiye aracılık etmektedir (Gauthier ve ark., 1996 ve Gauthier ve ark., 1998).

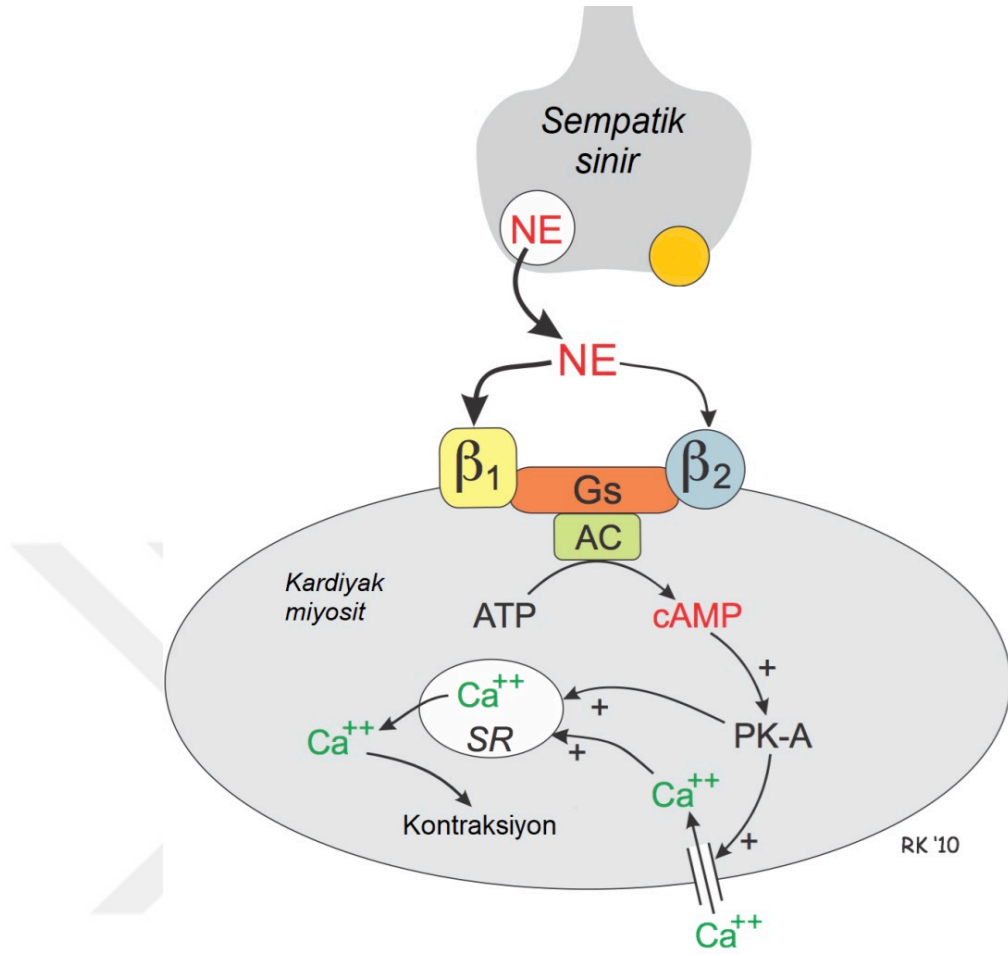
β -AR sinyal düzeyi, reseptörlerin fonksiyonel durumları ve reseptör yoğunluğu ile ilişkilidir (Steinberg, 1999). İnsan kalbinde β_1 - ve β_2 -AR alt tipleri ventriküllerde %70–80:%20–30 oranında, atriumlarda ise %60–70:%30–40 oranında ifade edilmektedir (Brodde, 1991). İlginç bir şekilde, (Rodefeld ve ark., 1996) insan sinoatriyal düğümlerinde β -AR yoğunluğunun, atriyal miyokarddakinden 3 kat daha yüksek olduğunu bulmuştur. Ayrıca, kalpte genel olarak β_1 -AR alt tipinin baskın olmasına karşın, sinoatriyal düğümdeki β_2 -AR yoğunluğunun sağ atriyal miyokardiyuma göre 2,5 kat daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (Brodde ve Michel, 1999). Tanımlanan son kardiyak β -AR alt tipi olan β_3 -AR kardiyovasküler sistemde sayısız fonksiyona sahip, insan kalbindeki diğer β -AR izoformlarına göre en düşük ifadenme oranına sahiptir. Bu nedenle, fizyolojik koşullar altında, bu β -AR alt tipinin katekolaminlerin kardiyovasküler etkilerine aracılık etmesinde daha az rol oynadığı düşünülmektedir (Kayki-Mutlu ve ark., 2019a).

1.2.3.1. Beta Adrenerjik Reseptörlerin Hücre İçi Sinyal Transdüksiyon Yolakları

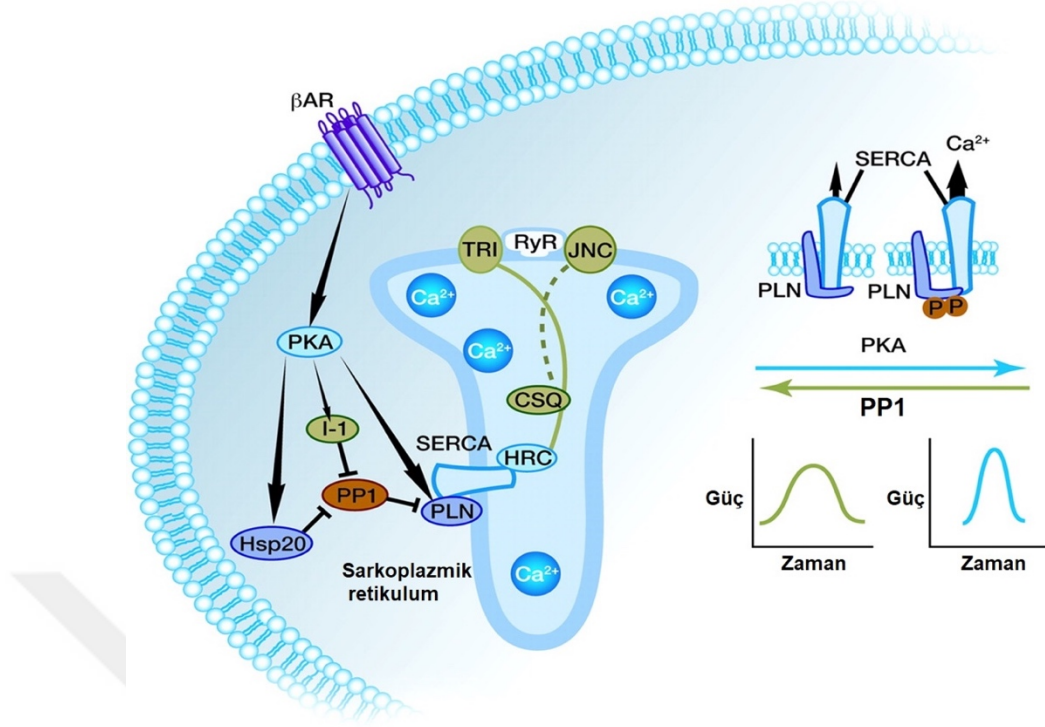
Kardiyomiyositlerde ifadelenen β -AR alt tiplerinin fonksiyonel özellikleri ve sinyal yolakları farklılık göstermektedir (Steinberg, 1999). Kardiyak β_1 - ve β_2 -

AR'nin uyarılması kenetli oldukları stimüle edici G proteini ($G\alpha_s$) üzerinden adenilat siklaz-siklik monofosfat-protein kinaz A (AC-cAMP-PKA) yolağını uyarmakta, böylece pozitif inotropik ve kronotropik etki oluşmaktadır (Şekil 1.7). β_1 - ve β_2 -AR'lerin uyarılması ile reseptörler $G\alpha_s$ 'a bağlanarak AC'yi aktive etmekte ve cAMP'nin hücre içi seviyesini arttırmaktadır (George ve Pitt, 2006). Bu, L-tipi Ca^{++} kanalları ve fosfolamban (PLN) dâhil olmak üzere birkaç sarkolemmal proteini fosfor yapan PKA'nın aktivasyonuna yol açmaktadır (Kaumann ve Molenaar, 1997). Artmış PKA aktivitesi L-tipi Ca^{++} kanallarının fosforilasyonunu ve Ca^{++} akışını arttırmaktadır. Sonuç olarak, hücre içi Ca^{++} düzeyleri artarak kardiyak kontraktilete sağlanmaktadır. Buna ek olarak PLN fosforilasyonu, sarkoplazmik retikulum içine Ca^{++} alımını artırarak, diastolik gevşemede rol oynamaktadır (Brodde ve Michel, 1999) (Şekil 1.8 ve 9). $G\alpha_s$ 'lara ek olarak, β_2 -AR'ler, inhibitör G-proteinine ($G\alpha_i$) proteinine bağlanarak AC inhibisyonuna neden olmaktadır. Dahası, $G\alpha_i$ birleşmesi, fosfolipaz 2 (PLA2), fosfosinositid 3 kinaz (PI3K) ve protein kinaz B (Akt)'yi aktive ederek kardiyak miyositlere karşı bir antiapoptotik sinyal üretilmesine aracılık etmektedir (Kayki-Mutlu ve ark., 2019a).

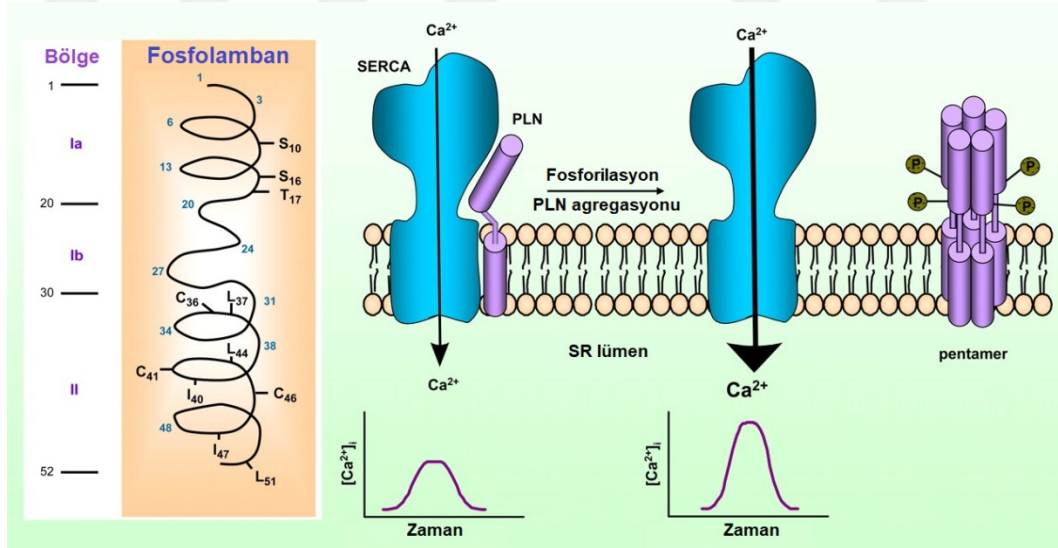
Klasik olarak β_1 ve β_2 -AR'lerin aksine β_3 -AR'ler $G\alpha_i$ 'ye bağlanarak kalpte negatif inotropik etkiyi oluşturmaktadır (Dzimiri, 1999 ve Gauthier ve ark., 1996). Bu etkiye nitrik oksit-siklik guanozin monofosfat-protein kinaz G (NO-cGMP-PKG) yolağı aracılık etmektedir (Gauthier ve ark., 1998) (Şekil 1.10). β_3 -AR'lerin uyarılması sonucunda aktive olan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) veya nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) NO üretimini arttırmakta ve ardından çözülebilir guanilat siklaz (sGC) aktivasyonuna neden olmaktadır. Sonrasında hücre içi cGMP miktarı artarak cGMP bağımlı PKG aktive edilmektedir. Sonuç olarak, troponin I ve L-tipi Ca^{++} kanalı fosforile edilerek negatif inotropi meydana gelmektedir (Cannavo ve Koch, 2017).



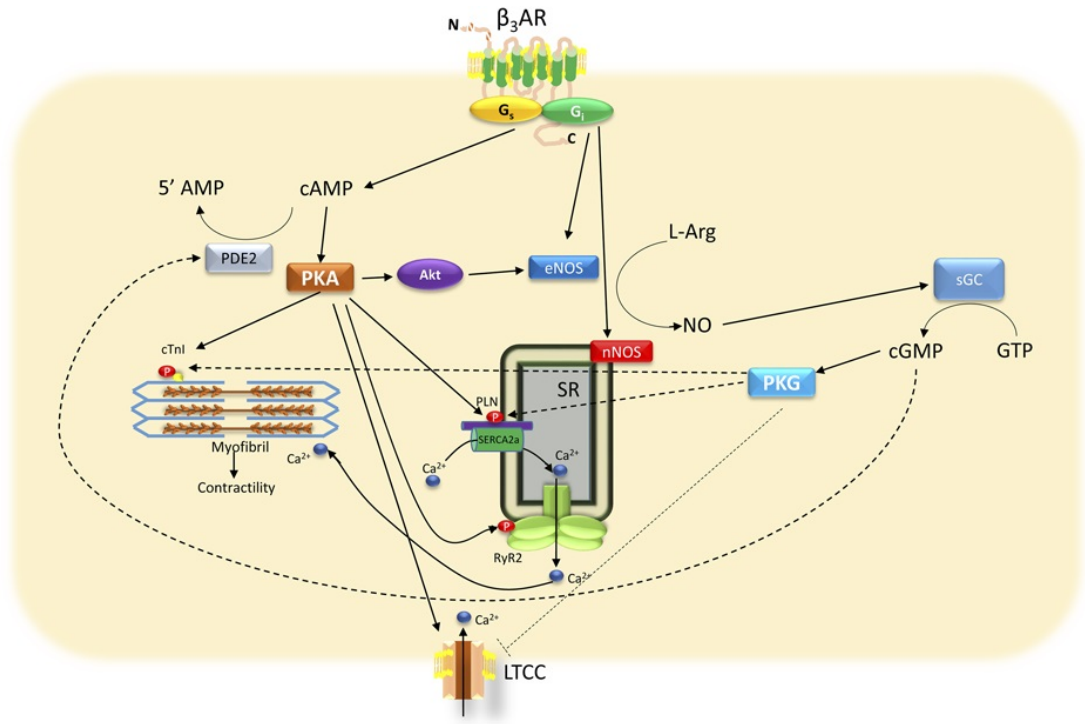
Şekil 1.7. β_1 ve β_2 -AR'ün hücre içi sinyal transdüksiyon yolağı (Klabunde, 2019). NE, noradrenalin; Gs, stimüle edici G proteini; AC, adenilat siklaz; cAMP, siklik adenzin monofosfat; ATP, adenzin trifosfat; SR, sarkoplazmik retikulum; PKA, protein kinaz A.



Şekil 1.8. PLN/SERCA aktivitesinin düzenlenmesinde β adrenerjik agonist uyarımı (Kranias ve Hajjar, 2012). PKA aktivasyonu, β -AR stimülasyonunun SR'ya Ca^{++} taşınması ve kasılma üzerindeki uyarıcı etkilerini artıran PLN fosforilasyonuna neden olur.



Şekil 1.9. PLN'nin modellenmesi (Kranias ve Hajjar, 2012). Üç alan vardır: Fosforile Ser16 ve Thr17 bölgelerini içeren sitozolik alan Ia, pentamer stabilizasyonu ve SERCA2a'nın fonksiyonel regülasyonunda önemli olan aminoasitleri içeren sitozolik domain Ib ve transmembran domain II. PLN monomeri SERCA2a ile etkileşime girerek SERCA2a aktivitesini inhibe ederken, PLN fosforilasyonu pentamerik birleşmeye ve PLN'nin SERCA2a üzerindeki inhibitör etkilerinin hafiflemesine yol açar.



Şekil 1.10. Kardiyomiyositlerde β_3 -AR sinyal aktivasyonunun şematik gösterimi (Cannavo ve Koch, 2017).

1.2.4. Diabetik Kalpte Beta Adrenerjik Reseptörler

Kardiyak β -AR'lerin kalp fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamasıyla birlikte kardiyovasküler hastalıklardaki etkilerinin de üzerinde durulmaktadır. Kardiyak patolojilerde katekolamin düzeyleri artmaktadır. Bu durum kardiyomiyosit membranındaki reseptörlerde duyarsızlaşmaya ve reseptör aracılı yanıtlarda azalmaya neden olmaktadır (Thackeray ve ark., 2011). Artan sempatik aktivite ve azalan β -AR ifadenmesinin son dönem kalp yetmezliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bristow ve ark., 1982; Brodde, 1991; Gauthier ve ark., 1996 ve Lameris ve ark., 2000).

Bununla beraber, β -AR yanıtlarındaki bozukluğun diyabetin yol açtığı kardiyak disfonksiyonda önemli bir rol oynadığı birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Diabetik hayvanlar ile yapılan çalışmalarda kalp preparatında β -AR

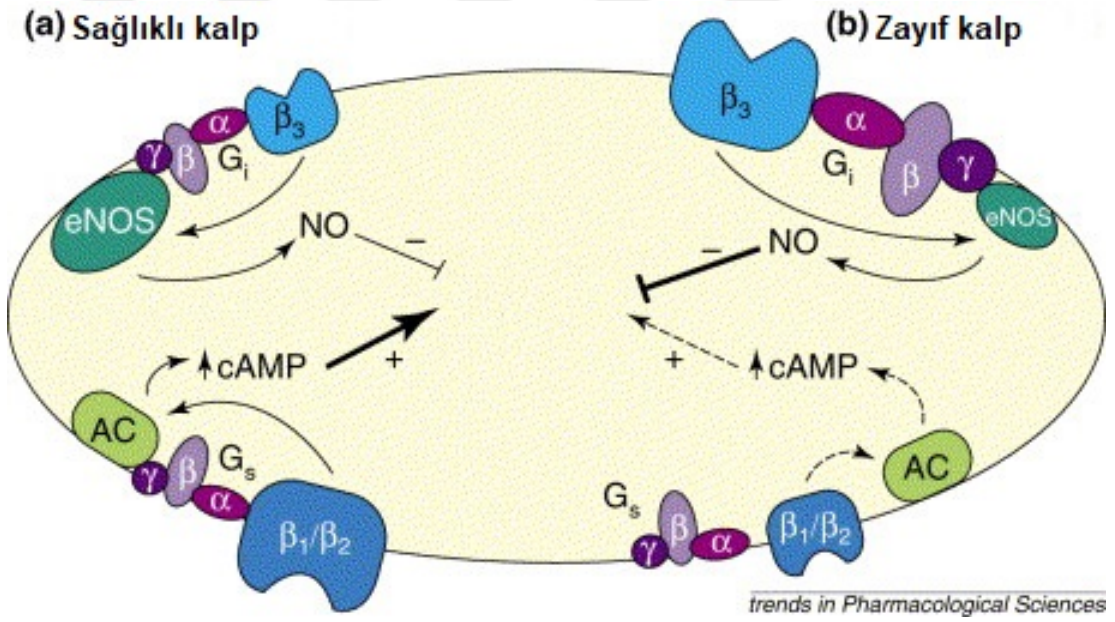
agonist stimülasyonunun inotropik ve/veya kronotropik etkilerine karşı azalan yanıt verebilirliği gösterilmiştir. Deneysel T1D hayvanları kullanan (Foy ve Lucas, 1976) diabetin bradikardiye neden olduğunu göstermiştir. Bu araştırmacılar aynı zamanda, diabetik hayvanların noradrenalinin presör etkisine ve izoprenalinin pozitif kronotropik ve inotropik etkilerine karşı daha az duyarlı olduklarını bulmuşlardır. Bu depresif kardiyak yanıtların altında yatan mekanizmanın kardiyak β -AR yoğunluğunun ve/veya fonksiyonunun azalması ile açıklanabileceği düşünülmüştür. (Savarese ve Berkowitz, 1979) daha sonra bu bulguları doğrulamakla kalmamış, aynı zamanda elde ettikleri sonuçları β -AR yoğunluğundaki azalma ile ilişkilendirmiştir. Sonrasında, birçok araştırma grubu deneysel diabetik hayvan kalbinde β -AR yoğunluğundaki azalmayı doğrulamıştır (Atkins ve ark., 1985; Gando ve ark., 1997; Heyliger ve ark., 1982; Latifpour ve McNeill, 1984 ve Sundaresan ve ark., 1984).

Dinçer ve ark. (2001)'in sıçanlar ile yaptığı bir çalışmada 14 haftalık streptozotosin (STZ) ile indüklenen diabet sonucunda sıçanların kalbindeki β_1 -AR mRNA ve protein ifadesinin azaldığı, β_2 -AR mRNA ifadesinin ise arttığı bulunmuştur. Bidasee ve ark. (2008)'in yaptığı başka bir çalışmada, 7 haftalık STZ ile indüklenen diabetik sıçan ventriküllerinde β_1 - ve β_2 -AR protein ifadesinin azaldığı bulunmuştur (Bidasee ve ark., 2008). Bunlara ek olarak, yüksek yağ diyeti (HFD) ve STZ ile indüklenen diabetik sıçan modeli ile yapılan çalışmalarda, kardiyak β_1 -AR (Haley ve ark., 2015 ve Thackeray ve ark., 2011) ve β_2 -AR (Haley ve ark., 2015) protein ifadesi azalmıştır. Bu veriler, özellikle β_1 -AR ifadenmesi ve/veya fonksiyonundaki azalmanın, diabetik hayvanların kardiyak iletim bozukluğunda önemli bir rol oynayabileceği kavramını desteklemektedir.

Bu verilerin aksine, diabet ile kalpteki β_3 -AR mRNA (Dincer ve ark., 2001 ve Kayki-Mutlu ve ark., 2014) ve β_3 -AR protein ifadesinde (Amour ve ark., 2007; Amour ve ark., 2008; Bidasee ve ark., 2008 ve Kayki-Mutlu ve ark., 2019b) artış bulunmuştur. Sağlıklı kalpte minimal düzeyde olan β_3 -AR stimülasyonu ve negatif inotropik etkinin diabetik kalpte belirgin hale gelmesi, diabetin erken dönemlerinde

artan sempatik aktivasyona karşı koruyucu bir mekanizma olarak yorumlanmaktadır (Amour ve ark., 2007).

Bu çalışmalara ek olarak, diabetik kalpte meydana gelen β -AR yoğunlukları ve fonksiyonlarındaki değişikliklere diabet tedavinin etkisi incelenmiştir. Diabet ile azalan β_1 -AR protein ifadesinin insülin tedavisi ile arttığı gösterilmiştir (Dincer ve ark., 2001 ve Haley ve ark., 2015). Diabetin neden olduğu β_1 -AR aracılı yanıtverirlikteki azalma sitagliptin tedavisi ile düzelmiştir (Uyar-Boztas ve ark. 2017). Buna ek olarak, diabet ile artan β_3 -AR ifadesinin ve β_3 -AR'nin aracılık ettiği yanıtların insülin tedavisi ile kontrol değerlere düştüğü bildirilmiştir (Arioglu-Inan ve ark., 2013; Dincer ve ark., 2001 ve Kayki-Mutlu ve ark., 2019b).



Şekil 1.11. Sağlıklı ve zayıf kalp kasında inotropik olarak zıt etki gösteren β -AR'lerin hipotetik rolü (Gauthier ve ark., 2000). NO, nitrik oksit; AC, adenilat siklaz; eNOS, endotelyal nitrik oksit sentaz.

1.3. Amaç

Kardiyovasküler hastalıklar, diabeti olan kişilerde morbidite ve mortalitenin birincil nedenidir. Diabete bağlı kardiyovasküler komplikasyonların önlenmesi için glisemik kontrolün sağlanması önemlidir, ne var ki, tek başına yeterli değildir. Bu nedenle, diabet tedavisinde kardiyovasküler hastalıklar üzerine olumlu etkileri olan ilaçların kullanımı önemli hale gelmiştir. T2D tedavisinde yeni kullanılmaya başlanan SGLT2i'ler çoklu etkileri olan antihiperglisemik bir ilaç grubudur. SGLT2i'lerin plazma açlık kan şekerini, HbA_{1c}'yi, kan basıncını ve plazma lipid düzeylerini düşürdüğü, beden kütle indeksini azalttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, T2D hastalarının geniş bir popülasyonunda KV ölüm oranını azalttığı ve HFrEF'i önemli derecede düşürdüğü gösterilmiştir. Dahası, bu grup ilacı olan dapagliflozinin HFrEF olan T2D hastalarında HFrEF, KV ölüm ve ACM'yi düşürdüğü bildirilmiştir.

SGLT2i'lerin gösterilen bu olumlu etkilerinin mekanizmaları ise tam olarak açıklanamamıştır. Bazı araştırmacılar, bu grubun söz konusu yararlarını natriürece bağlı hemodinamik etkiler ve glukozüriye bağlı metabolik etkilerle açıklamaya çalışmıştır (Lahnwong ve ark., 2018). Öte yandan, bazı araştırmacılar ise kardiyoprotektif etkiyi STAT3 yolağı aktivasyonu (Lee ve ark., 2017); nörohormonların modülasyonu (Shi ve ark., 2017); Na⁺/H⁺ değiştirici (NHE) (Uthman ve ark., 2018), ateroskleroz (Han ve ark., 2017), inflamasyon (Ye ve ark., 2017), oksidatif stres (Oelze ve ark., 2014) ve apoptoz (Zhou ve Wu, 2017) inhibisyonu etkileri ile ilişkilendirmiştir. Buna karşın, bu etkilerin β -adrenerjik yanıtverirlik ile ilişkisi henüz incelenmemiştir. Kardiyak β -AR ifadenmesi/yanıtverirliğindeki değişimlerin diabetin yol açtığı kardiyak komplikasyonlara katkısı düşünüldüğünde, SGLT2i'lerin kardiyak β -AR'lere etkisinin araştırılması önem kazanmaktadır. Bu noktadan hareketle, çalışmamızda HFD ve düşük doz STZ ile indüklenen diabetik sıçan modelinde bir SGLT2i olan dapagliflozinin kardiyak β -AR aracılı yanıtverirliğe olası etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Gereçler

2.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

- %95 O₂/%5 CO₂ içeren gaz karışım tüpü
- %100 O₂ içeren gaz tüpü
- Analizör (Cobas 6000: e 501 ve e601 modülleri, Roche, USA)
- Anestezi cihazı (Harvard Apparatus, USA)
- Anestezi kafesi (*Animal anesthesia chamber*) (MAY, Commat Ltd., Ankara, TR)
- Basınç-hacim kateteri ve data analiz sistemi (Transonic, USA)
- Bilgisayar kontrollü data kaydedici-1 (BioPac Systems, MP35, USA)
- Bilgisayar kontrollü data kaydedici-2 (BioPac Systems, MP100A-CE, USA)
- Buzdolabı (+4°C) (Arçelik, TR)
- Buz makinesi (HOSHIZAKI, FM-120DE, J)
- Cam malzemeler (Beher, mezür, petri vs.)
- Cerrahi iplik (ipek, 3.0) (Doğsan, TR)
- Cerrahi makas ve pensler (INOX, DE)
- Çalkalayıcı-1 (IKA®-WERKE, Type OS 10K, DE)
- Çalkalayıcı-2 (MRC, KDS 3016, RC)
- Derin dondurucu-1 (-20°C) (Arçelik, TR)
- Derin dondurucu-2 (-80°C) (Nüve, DF 490, TR)
- Eldiven (Nitril)
- Elektroforez tankı (Bio-Rad, USA)
- Enjektör (1ml) (Hayat®, TR)
- Enjektör (Polietilen) (Çeşitli hacimlerde)
- Film basma kaseti (Amersham, UK)
- Film geliştirici ve durdurucu çözeltilerin konulduğu kaplar

- Film, röntgen (Medical X-ray blue/MXBE film) (Carestream, USA)
- Filtre kâğıdı 0.45µm (*Cellulose acetate filter*) (Sartorius Stedim, DE)
- Gazlı bez (steril)
- Güç kaynağı-1 (PowerPac Basic (300V,400mA,75W), Bio-Rad, USA)
- Güç kaynağı-2 (*Stimulus isolation power supply*) (MAY, ISO 150-C, Commat Ltd., Ankara, TR)
- Güç transdüseri (F30 HSE, Force transducer Type 372, Harvard Apparatus, DE)
- Hassas terazi-1 (SCALTEC, SBA 31, Heiligenstadt, DE)
- Hassas terazi-2 (KERN ABJ 220, DE)
- Havan ve havan eli (porselen)
- İkili petri kabı (Type 866, Hugo Sachs Elektronik, DE)
- İnkübatör-1 (Kuru) (Blur Pard, PH050A, RC)
- İnkübatör-2 (*Dry bath*) (MAJOR SCIENCE, California, USA)
- Kaba Terazi (SCALTEC, SBA 61, Heiligenstadt, DE)
- Kronometre
- Langendorff perfüze kalp sistemi
- Likit nitrojen tankı
- Manyetik karıştırıcı-1 (Isıticılı) (Heidolph, Schwabach, DE)
- Manyetik karıştırıcı-2 (Isıticılı) (MToro, MS300HS, KP)
- Membran-1 (Nitroselüloz) (Bio-Rad, USA)
- Membran-2 (PVDF) (Bio-Rad, USA)
- Mikro plaka (96 kuyucuklu)
- Mikroplaka okuyucu (Molecular Devices, SpektraMAX® 190, USA)
- Operasyon masası (*Small animal operating table* Type 861 (*with heating controller* 24V/40W) (Harvard Apparatus, DE)
- Otoklav (ALP, J)
- Ölçüm cihazı ve test stribi (Kan şekeri ölçümü için) (Bayer, Contour Plus, CH)
- Parafilm (Bemis Company, Inc., USA)
- pH metre (ISOLAB, TR)

- Pipet-1 (Multiple ® Xstream) (Eppendorf, Hamburg, DE)
- Pipet-2 (Otomatik) (1-10 µl; 20-100µl; 100-1000µl) (Alfagen, TR)
- Pipet-3 (Otomatik) (1-10µl; 20-100µl; 100-1000µl) (Eppendorf, Hamburg, DE)
- Pipet uçları (10, 100 ve 1000 µl hacimlerinde) (Vertex/USA Scientific, USA)
- Plastik malzemeler (Standart ve *DNase Free* özellikte)
- Pompa-1 (Compact Drive) (Masterflex L/S, 7021-24, Illinois, USA)
- Pompa-2 (Reglo) (ISMATECH, ISMA 827, DE)
- Poşet ağzı kapatma makinası (King Star)
- Sıcaklık ayarlayıcı (Temperature Controller DC for Steiert Papillary muscle organ bath, Type 391/1, Harvard Apparatus, DE)
- Santrifüj-1 (Hettich, EBA 12, Tuttlingen, DE)
- Santrifüj-2 (Soğutmalı) (Hettich, Micro 200R, Tuttlingen, DE)
- Santrifüj-3 (Soğutmalı) (Hettich, Rotina 35R, Tuttlingen, DE)
- Santrifüj-4 (*Quick*) (HERMLE, Z 160 M, Wehingen, DE)
- Sonikatör (BANDELIN Sonoplus, HD 2200, Berlin, DE)
- Spatül (metal ve porselen)
- Steiert yatay süperfüzyon sistemi (Type 813, Hugo Sachs, Harvard Apparatus, USA)
- Stimülatör (Grass S44, USA)
- Su banyosu (*Heating circulator*) (MAY, WBC3044-PR, Commat Ltd., Ankara, TR)
- Su vakum pompası (JPV, Velp Scientifica, I)
- Transdüser (*Isometric force displacement*) (May FDT 10, Commat Ltd., Ankara, TR)
- Transdüser amplifikatörü (MAY, BA-97, Commat Ltd., Ankara, TR)
- Tüp (santrifüj için) (0,4; 0,5; 1,5; 2; 15 ve 50 ml hacimlerinde) (ISOLAB, DE)
- Transfer kaseti (Bio-Rad, USA)
- Transfer tankı (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, USA)

- Vakumlu süzme seti (Erlen, vakum başlığı, süzme haznesi, süzme seti kışkacı)
- Veri kayıt/analiz sistemi-1 (MP100, Biopac-System Inc, USA)
- Veri kayıt/analiz sistemi-2 (MP35, Biopac-System Inc, USA)
- Vorteks-1 (SCIOLOGEX, MX-S, Connecticut, USA)
- Vorteks-2 (Velp Scientifica, I)



2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Akrilamid/Bis Solüsyonu (%40, 37,5:1) (Bio-Rad, USA)
- Amonyum persülfat (Bio-Rad, USA)
- Antikor (birincil) (α -tubulin, ab4074, Abcam, Cambridge, UK)
- Antikor (birincil) (β_3 -AR, ab101095, Abcam, Cambridge, UK)
- Antikor (birincil) (GRP78, ab21685, Abcam, Cambridge, UK)
- Antikor (birincil) (eNOS, CST9572, Cell signaling, USA)
- Antikor (birincil) (PLN, CST8495, Cell signaling, USA)
- Antikor (birincil) (p-PLN (PLN^{ser16/thr17}), CST8496, Cell signaling, USA)
- Antikor (birincil) (SERCA2a, CST4388, Cell signaling, USA)
- Antikor (ikincil) (Antirabbit, CST7074, Cell signaling, USA)
- BCA Kiti (Thermo Scientific, Pierce™ BCA, USA)
- Bovine serum albumin (BSA) (Equitech Bio, Inc., USA)
- Bromfenol blue (Sigma-Aldrich, USA)
- CL 316,243 (Cayman Chemical, 17499, USA)
- Dapagliflozin (Forziga, AstraZeneca, USA)
- Desipramin (Sigma-Aldrich, DE)
- Dietil eter (Merck, DE)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (CH_3SOCH_3) (Carlo Erba, IT)
- Dithiothreitol (Bio-Rad, USA)
- ECL solüsyonu (Clarity, Bio-Rad, USA,)
- Enoksaparin (Clexane, Sanofi, TR)
- Etanol
- Fenoterol (Sigma-Aldrich, DE)
- Film banyosu developer çözeltileri (Konax, TR)
- Film banyosu fikser çözeltileri (Konax, TR)
- Forskolin (Sigma-Aldrich, USA)
- Gliserol (Sigma-Aldrich, DE)
- Glisin (Bio-Rad, USA)
- Glukoz monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, E)

- Heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat, İstanbul, TR)
- İzofluran (Piramal Critical Care Inc./ADEKA, USA/TR)
- İzoprenalin (Sigma-Aldrich, RC)
- İzopropanol (Sigma Aldrich, DE)
- Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, DE)
- Kollajenaz tip 2 (Worthington, USA)
- Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, DE)
- Membran strip solüsyonu (Nyztech, PT)
- Metanol (Merck, Sigma Aldrich, DE)
- Nadolol (Sigma-Aldrich, DE)
- Noradrenalin (Sigma-Aldrich, USA)
- Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich, DE)
- Potasyum klorür (KCl) (Sigma-Aldrich, DE)
- Prazosin (Sigma-Aldrich, DE)
- Proteaz inhibitör kokteyl (Sigma-Aldrich, USA)
- Protein markeri (PageRuler, Pierce, Thermo, USA)
- RBS Cleaning agent (Medline Scientific, UK)
- RIPA tamponu (Sigma-Aldrich, USA)
- Selüloz asetat filtre (Sartorius AG, Goettingen, DE)
- Sıçan yemi (Optima A.Ş., Bolu, TR)
- Sıçan yemi (%35 yağ) (OpenSourceDiet D12492, ARDEN, Ankara, TR)
- Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Sigma-Aldrich, DE)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Bio-Rad, USA)
- Sodyum klorür (NaCl) (Sigma-Aldrich, DE)
- Sodyum ortovanadat (Sigma-Aldrich, USA)
- Streptozotosin (Sigma-Aldrich, DE)
- TEMED (Bio-Rad, USA)
- Tris (Bio-Rad, USA)
- Tris buffered saline (TBS) (Bio-Rad, USA)
- Tris/Glisin/SDS tamponu (TGS) (Bio-Rad, USA)
- Tween 20 solüsyonu (Bio-Rad, USA)

2.2. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmamız için Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Deney Hayvanları Ünitesi'nden 52 adet 5 haftalık (100-150 g) erkek Sprague-Dawley sıçan alınarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanı Barındırma ve Kullanım Ünitesi'ne yerleştirilmiştir. Deney protokolü başlamadan önce sıçanların bu üniteye alışmaları için bir haftalık karantina süresi uygulanmıştır. Sıçanlar bu üniteye 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda (07.00-19.00 saatleri arası aydınlık, 19.00-07.00 saatleri arası karanlık), $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklık ve %30-70 sabit nemde tutulmuştur. Barındıkları süre boyunca sıçanlar yem ve su (çeşme suyu) kısıtlaması yapılmaksızın (*ad libitum*) beslenmiştir.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 11/03/2015 tarih ve 2015-4-82 sayılı onayı alınarak yapılmıştır (Ek.1).

2.2.1. Deney Grupları

Çalışmamızda 4 deney grubu bulunmaktadır. Bunlar:

- i. Kontrol grubu (K) ($n=14$): Normal yem (Çizelge 2.1) ile beslenmişlerdir.
- ii. Tedavili kontrol grubu (KT) ($n=13$): Normal yem ile beslenmiş ve 12 hafta boyunca dapagliflozin ile tedavi edilmiştir.
- iii. Diabetik grup (D) ($n=14$): HFD (Çizelge 2.2) ve düşük doz STZ ile diabet oluşturulmuştur.
- iv. Tedavili diabetik grup (DT) ($n=13$): HFD (Çizelge 2.2) ve düşük doz STZ ile diabet oluşturulmuş ve 12 hafta boyunca dapagliflozin ile tedavi edilmiştir.

2.3. Kullanılan Yöntemler

2.3.1. Diabetin Oluşturulması

6 haftalık sıçanlar 4 hafta boyunca HFD (%35g/g yağ içeren diyet, Çizelge 2.2) ile beslendikten sonra 0,1 N pH: 4.5 sitrat tamponu içinde çözülen 25 mg/kg STZ'nin *intraperitoneal* (i.p.) olarak uygulanması ile diabet oluşturulmuştur. STZ uygulamasından 72 saat sonra kuyruk kanından glukoz ölçüm stripleri aracılığıyla kan şekerine bakılmıştır. Kan şekeri 200 mg/dl'nin üzerinde olan sıçanlar diabet kabul edilmiştir. Bazı sıçanlarda ilk STZ dozu uygulamasından sonra kan şekeri artmış olmasına rağmen bir süre sonra kan şekeri normal seviyeye dönmüştür. Bu nedenle sıçanlarda diabetin gelişiminden emin olmak için tedavi öncesinde iki hafta beklenilmiştir. Kan şekeri 200 mg/dl'nin altında olan sıçanlarda STZ injeksiyonu tekrarlanmıştır. Buna karşın kan şekeri hala 200 mg/dl'nin altında olan sıçanlar grup dışı bırakılmışlardır.

2.3.2. Tedavi

Kontrol ve diabetik grup olmak üzere toplam iki grupta SGLT2i dapagliflozin tedavisi 1 mg/kg/gün dozunda oral olarak uygulanmıştır. Diabetik hayvanlarda diabetin oluşmasından iki hafta sonra tedaviye başlanmıştır. Tedavi 12 hafta boyunca uygulanmıştır.

Çizelge 2.1. Sıçanların normal yem bileşenleri listesi

Bileşenler	Açıklama
Soya fasulyesi kuspesi	Genetiği değiştirilmiş soya fasulyesinden elde edilmiştir: ACS-GMO05-3, MON-O4032-6, MON-89788-1
Bonkalit	
Mısır	
Pirinç kepeği	
Bitkisel yağ	Genetiği değiştirilmiş soya fasulyesinden elde edilmiştir: ACS-GMO05-3, MON-O4032-6, MON-89788-1
Melas	
Kalsiyum	
Karbonat	
Di kalsiyum fosfat	
Tuz vitamin-mineral karışımı	
Maya	
Mitoksin bağlayıcı	
Küf önleyici	
Analitik bileşenler (%)	
Ham protein	23,0
Ham selüloz	2,52
Ham yağ	5,08
Ham kül	7,17
Lizin	1,36
Metiyonin	0,51
Kalsiyum	1,11
Fosfor	0,76
Sodyum	0,25
İz Elementler	
E2 İyot (kalsiyum iyot anhidrat)	0,8 mg/kg
E3 Kobalt (kobalt karbonat monohidrat)	0,15 mg/kg
E4 Bakır (bakırsülfat pantahidrat)	10 mg/kg
E5 Mangan (mangan oksit)	50 mg/kg
E6 Çinko (çinko oksit)	50 mg/kg
E8 Selenyum (sodyum selenit)	0,15 mg/kg
Katkı maddeleri-Vitaminler	
E672 Vitamin A	36000 İ.Ü./kg
E671 Vitamin D3	6520 İ.Ü./kg

Çizelge 2.2. Sıçanların yüksek yağlı yem bileşenleri listesi

Ürün No: D12492*		
	Gr (%)	Kcal (%)
Protein	26,2	20
Karbonhidrat	26,3	20
Yağ	34,9	60
Toplam kcal/gr	5,24	
Bileşenler		
Kazein, 30 meş	200	800
L-sistin	3	12
Mısır nişastası**	0	0
Maltodekstrin 10	125	500
Sükroz	68,8	275,2
Selüloz, BW200	50	0
Soya yağı**	25	225
Domuz yağı***	245	2205
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5,5	0
Potasyum sitrat 1 H ₂ O	16,5	0
Vitamin karışımı V1001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
FD&C Mavi boya**	0,05	0
Toplam	773,85	4057

*Yemlerin hazırlanmasında Open Source Diet'in (USA) D12492 numaralı ürün formülü esas alınmış olsa da birkaç değişiklik yapılarak hazırlanmıştır.

**Formüldeki bu maddeler eklenmemiştir.

*** Domuz yağının Türkiye'de bulunması zor olduğu için yerine kuyruk yağı kullanılmıştır.

**** Tüm maddelerin karıştırılabilmesi için toplam miktarın %40'ı kadar su kullanılmıştır. Daha sonra bu su yemlerin kurutma işlemi sırasında buharlaşacağı için miktar göz ardı edilmektedir.

*****Bunlara ilaveten koruyucu olarak sitrik asit (0,01gr/su) kullanılmıştır.

2.3.2. Kan Şekeri Ölçümü

Haftalık Kan Şekeri Ölçümü

Sıçanlarda her hafta pazartesi günleri saat 12:00'da kan şekeri ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla, sıçanların kuyruklarından bir damla kan alınmış ve glukometre kullanılarak glukoz stripleri yardımıyla ölçüm yapılmıştır. Ölçüm öncesinde herhangi bir yem/su kısıtlaması uygulanmamıştır.

Oral Glukoz Tolerans Testi

Oral glukoz tolerans testi (OGTT) vücudun ana enerji kaynağı olan glukozun vücut tarafından kullanılma yeteneğini ölçen bir testtir. Bozulmuş glukoz toleransını teşhis etmek için; karbonhidrat metabolizması ve insülin sekresyonunu hakkında bilgi vermesi için kullanılan standartlaştırılmış bir testtir. Bu test, glukozun oral yoldan uygulanmasına ve daha sonra zamanla plazma glukoz ve insülin seviyelerinin izlenmesine dayanmaktadır.

Çalışmamızda, her gruptan sıçana (K, KT, D ve DT; $n=8$) deneyler başlamadan önceki hafta OGTT yapılmıştır. Bunun için öncelikle, sıçanlar 12 saat (21.00-09.00) aç bırakılmıştır. 12 saat açlık sonrası sıçanların kuyruklarından bir damla kan alınmış ve glukometre kullanılarak glukoz stripleri yardımıyla kan şekeri ölçüm yapılmıştır. Bu değerler 0. dakika kan şekeri/açlık kan şekeri (FBG) olarak kaydedilmiştir. Sonrasında, her bir sıçana oral gavaj ile 2 g/kg şeker verilmiştir. Bu şeker yüklemesinin ardından belli zaman aralıklarda (30., 60., 90. ve 120. dakika) yine kuyruktan alınan kan ile kan şekeri ölçümü yapılmıştır.

2.3.4. Serum Lipid Düzeylerinin Ölçümü

Deneşler için sakrifiye edilen sıçanların kanından elde edilen serum total, HDL ve LDL kolesterol ve trigliserid (TG) ölçümünde kullanılmıştır. Bu ölçümler Adana Devlet Hastanesi Laboratuvarında yapılmıştır.

2.3.5. Deney Öncesi Yapılan İşlemler

Deney günü hayvanların beden ağırlıkları ve kan şekerleri ölçülmüştür. Bu ölçümler sonrasında inhale anestezi madde (izofluran (%2) veya eter) yardımıyla uyutulan hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon sıçanların göğüs kafesi açılarak ve sonrasında kalbin aorttan kesilerek çıkarılması ile gerçekleştirilmiştir. Kalbin çıkarılması sonrası akan kan 2,5 ml'lik tüplere alınmıştır. Bu tüpler 3000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilerek serumu kandan ayrılması sağlanmış ve 2,5 ml'lik tüplere aktarılan serumlar daha sonra biyokimyasal parametrelere bakılmak üzere sıvı azot ile dondurulup -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

2.3.6. *In-vivo* Kardiyak Deneyler

Sıçanlar izofluran (%2) ile anestezi edilmek üzere sıçan anestezi kafesine konulmuştur. Daha sonra, anestezi altındaki sıçanlar operasyon masasına yatırılıp sabitlenmiştir. Operasyon masasının rektal probu 37°C'de sabit tutulmuştur. Sıçanların sağ karotid arteri izole edilerek küçük bir insizyon yapılmış ve ardından *in-vivo* basınç-hacim (PV) kateteri (transonic, 1.9F) bu kesiden damarın içine takılmıştır. Karotid basıncı kaydedildikten sonra kateter aşağı doğru itilerek sol ventrikülün içine yerleştirilmiştir. 10 dakikalık stabilizasyon süresinin sonunda elde edilen "loop"lar kaydedilmiştir. Standart looplar kaydedildikten sonra önyük (*preload*) değişimine kalbin yanıtverirliği incelenmesi için sıçanların karın bölgesi açılmış ve *vena cava* üzerine belli aralıklarla (5 saniyelik) basılar uygulanmış ve bu sırada yeni looplar kaydedilmiştir.

Sonrasında, sisteme ait veri kayıt/analiz sisteminde bu kayıtlar analiz edilmiş, sıçan kalbinin bazal hemodinamik parametreleri (sistol sonu kan basıncı (ESP), diastol sonu kan basıncı (EDP), sistol sonu hacmi (ESV), diastol sonu hacmi (EDV), kalp atım hacmi (SV), kardiyak debi (CO), kalp atım hızı (HR), ejeksiyon fraksiyonu (EF), kasılma ve gevşeme hızları (dP/dt_{max} ve dP/dt_{min}), izovolumik gevşeme sabiti (Tau)) ve önyük bağımsız hemodinamik parametreleri (sistol sonu basınç-hacim ilişkisi eğrisinin eğimi (ESPVR), diastol sonu basınç-hacim ilişkisi eğrisinin eğimi (EDPVR) ve önyük bağımsız kalbin atım gücü (PRSW)) hesaplanmıştır.

Hemodinamik ölçümler kaydedildikten sonra papiller kas deneyleri için sıçanların kalbi çıkarılmıştır.

2.3.7. Papiller Kas Deneyleri

In-vivo kardiyak deneyler sonrasında sıçanların kalpleri izofluran (%2) anestezisi altında izole edilerek, içinde heparinlenmiş ve oksijenlenmiş krebs çözeltisi (Çözelti formülü için Çizelge 2.3'e bakınız.) bulunan küçük cam behere konulmuştur. Kalp ağırlığı ölçüldükten sonra kalbin içindeki kandan temizlenmesi için yine heparinlenmiş ve oksijenlenmiş krebs çözeltisi bulunan özel petriye alınmıştır. Kalp damarları içindeki kan temizlendikten sonra kalp dokusu orta kısmından açılıp kalp duvarları akupunktur iğnesi ile petrinin silikon kısmına iğnelenmiş ve papiller kaslara ulaşıldıktan sonra sol ventrikül papiller kaslarından biri izole edilerek yatay organ banyosuna asılmıştır. Yatay süperfüzyon sistemine asılan papiller kas stimülatör ile uyarılarak (0,6 Hz, 2 ms, eşik voltaj değerinin 2 katı) 5 ml/dk hız ve 30°C'de perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda 10 μ m'lik artışlar ile papiller kas gerdirilerek L_{max} değeri (kasın geriminin en fazla olduğu değer) bulunmuştur. Daha sonra bu değer %90'ı hesaplanarak kas bu gerime sabitlenmiştir.

Sonrasında, sırasıyla β_2 -AR agonisti fenoterol (0,1nM-10 μ M), nonselektif AR agonisti noradrenalin (α -AR antagonisti prazosin (1 μ M) ve noradrenalin geri alım inhibitörü desipramin (10 μ M) varlığında) ve adenilat siklaz aktivatörü forskolin (3 μ M) ile konsantrasyon yanıt eğrileri elde edilmiştir. Her bir doz-yanıt çalışması arasında bazal değerine dönmesi için papiller kas krebs çözeltisi ile en az 30 dakika perfüze edilmiştir.

Papiller kas deneyleriyle elde edilen veriler Microsoft Excel'de açılan bir dosyaya kaydedilmiştir. Kullanılan agonistin konsantrasyonuna karşılık gelen her yanıt bazal değere oranlanarak yüzde (%) etki hesaplanmıştır. Hesaplanan % etkiler istatistik analiz için kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. Krebs çözeltisi formülü (Krebs-Hensleit *Solution*)

	MA	mM	1 Litre için (g)
NaCl	58,44	120	7,013
KCl	74,56	4,8	0,358
CaCl ₂ .2H ₂ O	147	1,25	0,184
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	1,25	0,308
KH ₂ PO ₄	136	1,2	0,163
NaHCO ₃	84,01	25	2,100
C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O	198,17	10	1,982

2.3.8. Langendorff Perfüze Kalp Deneyi

Eter anestezisi altındaki sıçanların göğüs kafesleri açılarak kalpleri çıkarılmıştır ve içinde pH'sı 7,4 olan heparinli ve buzlu krebs çözeltisi (Çizelge 2.3) bulunan petriye alınmıştır. Daha sonra kalp, zaman kaybetmeden aortasından kanüle edilerek langendorff sistemine asılmıştır. Kalp üzerindeki dokulardan ve atriumlarından temizlenmiştir ve %95 O₂/%5 CO₂ gaz karışımı ile 37°C'de pH:7,4'de sabit tutulan krebs çözeltisi ile perfüze edilmiştir. Ventriküler fonksiyonları ölçmek için bir ucu basınç transdüserine bağlı lateks balon boş olarak sol ventrikül içine yerleştirilmiştir. Balonun iç hacmi kademeli olarak arttırılmış,

artıŖa bağlı sol ventrikül pik basıncındaki artıŖ kaydedilmiŖtir. Sol ventrikül pik basıncındaki artıŖın durduğu sol ventrikül diastol sonu kan basıncı değeri balonun i hacmi olarak ayarlanmıŖtır. Sonrasında, apekse elektrot yerleŖtirilerek kalp dakikada 300 atım olacak Ŗekilde stimüle edilmiŖtir. Bu Ŗekilde 30 dakikalık perfüzyon sonrasında sırasıyla sabit akımda β_3 -AR agonisti CL 316,243 (0,1 pM- 1 μ M) ve sabit basınçta nonselektif β -AR agonist izoprenalin (0,01nM-1 μ M) varlığında kalbin fonksiyonel yanıtlarının değerlendirilmesi için sol ventrikül pik basıncı (LVDP; mmHg), sol ventrikül diastol sonu basıncı (LVEDP; mmHg) ve ventrikül basıncının artma ve azalma hızları (+dP/dt, -dP/dt; mgHg/s) ölçölmüŖtür.

Langendorff perfüze kalp deneyleriyle elde edilen veriler Microsoft Excel'de açılan bir dosyaya kaydedilmiŖtir. Kullanılan agonistin konsantrasyonuna karŖılık gelen her yanıt bazal değere oranlanarak % etki hesaplanmıŖtır. Hesaplanan % etkiler istatistik analiz için kullanılmıŖtır.

2.3.9. Western Blot Deneyleri

Western blot yöntemi ile SERCA2a, glukoz düzenleyici protein 78 (GRP78), β_3 -AR, eNOS, PLN, p-PLN ve kontrol gen (*housekeeping*) olarak α -tubulin proteinlerinin ifadeleri ölçölmüŖtür

Western blot deneyleri aŖaęıdaki aŖamalar takip edilerek gerekleŖtirilmiŖtir.

1. Kalp dokusundan protein homojenizasyonu (Total protein eldesi)
2. Protein konsantrasyonun belirlenmesi (Protein miktar tayini)
3. Proteinlerin kaynatılması (Denatürasyon)
4. Jel hazırlama
5. Proteinlerin jele yüklenmesi (*Loading*)
6. Jel elektroforezi (*Running*)
7. Jelden membrana aktarım (Transfer), jelin membrana emdirilmesi (*Blotting*)
8. Bloklama (*Blocking*)

9. Birincil (Primer) antikor ile muamele
10. Yıkama
11. İkincil (Sekonder) antikor ile muamele
12. Yıkama
13. Görüntüleme (ECL, *enhanced chemiluminescence*)
14. Analiz

2.3.9.1. Kalp Dokusunda Protein Homojenizasyonu

İlk olarak mekanik parçalama yapılmıştır. Bunun için dondurulmuş sol ventriküller likit nitrojen (-196°C) ile porselen havanda toz edilmiştir. Toz doku içinde lizis tamponu (RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer*), 1ml; Na₂VO₃ (sodyum ortovanadat), 200 mM (5µl); PIC (protein inhibitör kokteyl), 1/100 (10 µl) karışımı) bulunan dibi konik tüplere alınmıştır. Bu karışım buz üzerinde ultrasonikasyon ile homojenize edilmiştir ve elde edilen lizatlar +4°C’de 2 saat boyunca çalkalanarak lizatların ajitasyonu sağlanmıştır. Ardından +4°C ve 12000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek selüler debris atılmıştır. Alınan süpernatant +4°C ve 12000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında, tekrar süpernatant alınarak protein lizatı elde edilmiştir.

2.3.9.2. Protein Konsantrasyonun Belirlenmesi

Jele ortalama 5-100 µg arası protein yüklenir. Bunu hesaplamak için elimizde ne kadar total protein olduğunu bilmemiz gerekmektedir. Bunun için çalışmamızda Bikinkoninik asit protein miktar tayini (BCA *Protein Assay*) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, bazik ortamda bakırın (Cu⁺⁺) protein ile bakır katyonuna (Cu⁺) redüksiyonunun ardından Cu⁺’nın BCA ile yüksek duyarlılıkta ve kolorimetrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Birinci basamakta bazik ortamda protein ile Cu⁺⁺’nın şelasyonu gerçekleşmekte ve açık mavi renkte bir kompleks oluşmaktadır. İkinci basamakta ise ilk basamakta oluşan redüklenmiş bakır (Cu⁺) BCA ile tepkimeye girerek mor renkli bir ürün oluşmaktadır. BCA/Cu⁺ bileşiği suda

çözünmekte ve 562 nm absorbansta protein konsantrasyonları ile bir doğrusallık göstermektedir.

Farklı konsantrasyondaki standart numuneleri (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 µg/ml) ve kalp numuneleri 96 kuyucuklu mikro plakaya yüklenmiştir. Numunelerin 562 nm'deki absorbansları mikropkaya okuyucu ile ölçülmüştür. Değerlerin bir standart eğrisi çizilmiştir ve bu standart eğri yardımıyla kalp numunelerinin absorbanslardan konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

2.3.9.3. Proteinlerin Kaynatılması

Kaynatma işlemi (denatürasyon) proteinin jelde hareketini kolaylaştırmak için yapılmaktadır. Kaynatma ile proteinler arasındaki bağlar kırılmakta ve protein denatüre olarak düz hale gelmektedir. Bu işlem için örnek yükleme tamponu (*sample buffer, laemmlı*) adı verilen bir çözelti kullanılmaktadır. Protein ile örnek yükleme tamponu karıştırılarak 37°C inkübatörde 30 dakika ısıtılmıştır.

2.3.9.3.1. Örnek Yükleme Tamponu

Çalışmamızda iki farklı örnek yükleme tamponu kullanılmıştır. Bu tamponlar aşağıdaki formüllere (Çizelge 2.4) göre hazırlanmıştır. Öncelikle tris, gliserol, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve bromfenol mavisi bir cam behere konulmuş ve ardından istenilen ml'ye bidistile su ile tamamlanmıştır. Bu karışım tüm malzemeler çözünene kadar ısıtılarak karıştırılmıştır. Çözünen çözeltiye ditiyotretol (DTT) ilave edilmiştir. DTT de çözüldükten sonra çözelti küçük hacimde parçalara ayrılarak -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Çizelge 2.4. Örnek yükleme tamponu formülleri

	Laemmli (6x) (20 ml için)	Laemmli (2x) (50 ml için)
Tris baz (0,5 M; pH: 6,8)	12 ml	-
Tris baz (1 M; pH: 6,8)	-	5 ml
Gliserol	4,7 ml	12 ml
SDS	1,2 g	4 g
Bromfenol mavisi	0,006 g	0,010 g
Bidistile su	20 ml'ye tamamlanmıştır.	50 ml'ye tamamlanmıştır.
DTT	0,93 g	1,55 g

2.3.9.3.2. Numunelerin Hazırlanması

Jel kuyularına yüklenecek olan protein miktarı incelenen proteine göre değişmektedir. Kalp dokusunda ifadesi yüksek proteinler (α -tubulin, SERCA2a, GRP78, PLN, p-PLN gibi) için 10 μ g protein yeterli iken ifadesi az olan proteinler (β_3 -AR, eNOS gibi) için 100 μ g protein yüklenmesi gerekmektedir.

Öncelikle kuyulara ne kadar numune yükleneceği elimizdeki protein lizatı konsantrasyonuna göre hesaplanmıştır. Her numuneden μ l olarak aynı miktar yüklenmesi gerektiğinden aşağıdaki çizelgelere (2.5 ve 2.6) göre seçilen konsantrasyona uygun μ l protein lizat ve üzerine steril su ilave edilerek eşit hacimde yükleme yapılması sağlanmıştır. Ardından bu karışıma örnek yükleme tamponu (*Laemmli* 6X veya 2X) eklenmiştir. Sonrasında vorteks ile tam karışım sağlanarak 37°C inkübatörde 30 dakika (α -tubulin, SERCA2a, GRP78, β_3 -AR ve eNOS için) veya 100°C inkübatörde 5 dakika (PLN ve p-PLN için) bekletilerek proteinler denatüre edilmiştir. Böylece numuneler jele yüklenmeye hazır hale gelmiştir.

Çizelge 2.5. Numunelerin hazırlanması için gerekli lizat, steril su ve örnek tamponu miktarları (α -tubulin, SERCA2a, GRP78, β_3 -AR ve eNOS için)

Numune	Protein Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)	Lizat (μl) (100 μg protein için)	Steril su (μl)	6x Laemmlı (μl)
1	11653,8	8,6	7,4	3,2
2	12193,2	8,2	7,8	3,2
3	15345,0	6,5	9,5	3,2
4	8042,8	12,4	3,6	3,2
5	11485,3	8,7	7,3	3,2
6	12393,3	8,1	7,9	3,2
7	6457,0	15,5	0,5	3,2
8	12594,8	7,9	8,1	3,2
9	12058,7	8,3	7,7	3,2
10	14556,4	6,9	9,1	3,2
11	13524,9	7,4	8,6	3,2
12	12936,0	7,7	8,3	3,2
13	11309,2	8,8	7,2	3,2
14	12283,1	8,1	7,9	3,2
15	8213,2	12,2	3,8	3,2
16	13608,3	7,3	8,7	3,2
17	12400,6	8,1	7,9	3,2
18	12720,9	7,9	8,1	3,2
19	11875,6	8,4	7,6	3,2
20	11474,9	8,7	7,3	3,2
21	12840,6	7,8	8,2	3,2
22	11840,0	8,4	7,6	3,2
23	13704,4	7,3	8,7	3,2
24	11653,5	8,6	7,4	3,2
25	15612,1	6,4	9,6	3,2
26	13462,5	7,4	8,6	3,2

Çizelge 2.6. Numunelerin hazırlanması için gerekli lizat, steril su ve örnek tamponu miktarları (PLN ve p-PLN için)

Numune	Protein Konsantrasyonu (µg/ml)	Lizat (µl) (100 µg protein için)	Steril su (µl)	2X Laemmli (µl)
1	11703,2	8,5	7,5	16
2	10543,2	9,5	6,5	16
3	15345,0	6,5	9,5	16
4	8042,8	12,4	3,6	16
5	11485,3	8,7	7,3	16
6	11810,5	8,5	7,5	16
7	5916,8	15,5	0,5	16
8	11660,1	8,6	7,4	16
9	9843,5	10,2	5,8	16
10	16722,4	6,0	10,0	16
11	16020,2	7,4	8,6	16
12	11264,5	6,2	9,8	16
13	10575,6	8,9	7,1	16
14	12956,5	7,7	8,3	16
15	8098,8	12,4	3,7	16
16	11724,1	8,5	7,5	16
17	13345,9	7,5	8,5	16
18	10440,0	9,6	6,4	16
19	11180,7	8,9	7,0	16
20	9388,5	10,6	5,4	16
21	11189,1	8,9	7,1	16
22	10160,0	9,8	6,2	16
23	12686,0	7,9	8,1	16
24	10560,3	6,5	6,5	16
25	15657,0	6,4	9,6	16
26	13660,8	7,3	8,7	16

2.3.9.4. Proteinlerin Elektroforezi

2.3.9.4.1. Jel hazırlanması

Örneklerin elektroforezinde kullanılan jellerin konsantrasyon incelenen proteine göre değişmektedir ve jeller iki aşamada hazırlanmaktadır. İlk aşamada numunelerin ayrılmasını sağlayacak ayırıcı (*seperation*) jel aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır (Çizelge 2.7). Hazırlanan jel çözeltisi 1,5 mmlik boşluk oluşturacak şekilde yerleştirilen cam plakalar arasına döküldükten sonra üzeri izopropil alkol ile kapatılarak jelin üst yüzeyinin düzgün bir şekilde donması sağlanmıştır. Yaklaşık 1 saat sonra donan jelin üst kısmındaki alkol dökülmüştür. Alkol artıkları bidistile su ile ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra cam plakalar arasındaki jele dokunulmadan kurulama kâğıdı ile cam plakalar kurulanmıştır. Ayırıcı jel üzerine aşağıdaki formüle göre hazırlanan ve numunelerin yüklendiği toplayıcı (*stacking*) jel dökülmüştür (Çizelge 2.7). Hemen ardından yükleme yapılacak kuyuların oluşumunu sağlamak için 1,5 mm'lik 15 kuyucuklu tarak yerleştirilmiştir. Jelin donması için 1 saat beklenmiştir. Jel donduktan sonra jelin yükleme hazırlıkları yapılmıştır.

Jeller donduktan sonra üzerindeki taraklar çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiş ve tank elektroforez tamponu ile (1X TGS) doldurulmuştur. Sonrasında numuneler pipetlenerek jel kuyularına yüklenmiştir. Numuneler 30 dakika boyunca 50 volt (V), sonrasında 90 dakika boyunca 120V'da elektroforez edilerek numunelerin moleküler ağırlıklarına (kDa) göre ayrılmaları sağlanmıştır.

PLN ve p-PLN için trisin jeli (Çizelge 2.8), trisin örnek yükleme tamponu (*laemlli 2x*, Çizelge 2.4) ve elektroforez için anot/katot tampon çözeltileri (Çizelge 2.9 ve 10) hazırlanmıştır.

Çizelge 2.7. Jel formülü

	Ayrıcı jel formülü (1,5 mm) (2 jel için)			Toplayıcı jel formülü (1,5 mm) (2 jel için)
	%6 (ml)	%8(ml)	%10(ml)	%4-5 (ml)
Bidistile su	6,86	10,20	8,74	5,895
Gliserol	0,56	0,56	0,56	-
Tris.SDS (1.5 M, pH 8.8)	5,63	5,63	5,63	-
Tris.SDS (1.5 M, pH 6.8)	-	-	-	2,34750
Akrilamid/bisakrilamid(%30:%0,8)	9,38	6,00	7,50	1,03125
APS (%10)	0,11	0,11	0,11	0,09375
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,00938

Çizelge 2.8. Trisin jel formülü

	Ayrıcı jel formülü (1,5 mm) (2 jel için)	Toplayıcı jel formülü (1,5 mm) (2 jel için)
	%10 (ml)	%4 (ml)
Bidistile su	4,69	6,224
Gliserol	2,11	6,224
Tris.Cl/SDS (3 M, pH 8.45)	6,67	-
Tris.Cl/SDS (1.5 M, pH 6.8)	-	2,48
Akrilamid/bisakrilamid(%30:%0,8)	6,53	1,296
APS (%10)	0,11	0,09375
TEMED	0,01	0,00938

2.3.9.4.2. Katot ve Anot Tamponlarının Hazırlanması

Katot (Çizelge 2.9) ve anot tamponları (Çizelge 2.10) derişik şekilde (10X) hazırlanmışlardır ve deney günü bidistile su ile 1X'e seyreltilerek kullanılmıştır.

Çizelge 2.9. Katot tamponu formülü

Katot tamponu	10X için
Tris (2 M)	121,1 g
Trisin (0,1 M)	179,2 g
SDS (%20)	50 ml
Bisidistile su	1 L'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 2.10. Anot tamponu formülü

242,2 g Tris (2M) 700 ml suda çözdürülmüştür. pH:8,9 olana kadar HCl eklenmiştir. pH ayarı yapıldıktan sonra su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Anot tamponu	10X için
Tris (2 M)	242,2 g
HCl	pH:8,9 olana kadar eklenmiştir.
Bidistile su	1 L

2.3.9.4.3. Numunelerin Yüklenmesi

Donmuş jeller jel dökme aparatından alınarak elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Ardından, elektroforez tankının iç ve dış kısmı TGS (1X) tamponu ile doldurulmuştur. PLN ve p-PLN proteinlerinin elektroforezinde diğer proteinlerinkinden farklı olarak elektroforez tankının iç kısmı katot tamponu (1X), dış kısmı ise anot tamponu (1X) ile doldurulmuştur. Tank tampon ile doldurulduktan sonra donmuş jellerden taraklar çıkartılmıştır. Sonrasında numuneler pipetlenerek jel kuyularına yüklenmiştir. Her jelin ilk kuyusuna 2 µl protein markeri yüklenmiştir.

2.3.9.4.4. Elektroforez

Yükleme yapıldıktan sonra numuneler 30 dakika boyunca 30 volt (V), sonrasında 90 dakika boyunca 120 V'da elektroforez edilerek numunelerin moleküler ağırlıklarına (kDa) göre ayrılmaları sağlanmıştır.

2.3.9.5. Protein Örneklerinin Membrana Transferi

Elektroforez sonrası jeller alınarak transfer tamponunda yıkanmıştır. Sünger, filtre kâğıdı, jel, membran (PVDF veya NS), filtre kâğıdı ve sünger üst üste sıralanarak sandviçler oluşturulup bu sandviçler transfer kasetlerine yerleştirilmiştir. Kasetler tanka oturtulmuş, buz kalıbı da tanka konularak transfer tamponuyla

doldurulmuştur. Transfer tamponu (Çizelge 2.11) her deney için taze hazırlanmış ve +4°C'de soğutulmuştur. Transfer işlemi 100V'da 10 µg protein yüklemelerinde 2 saat, 100 µg protein yüklemelerinde 4 saat yapılmıştır. Transfer süresinin sonunda membran alınarak TBST (%1 Tween 20 içeren 1X TBS çözeltisi) ile 5 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır.

Çizelge 2.11. Transfer tamponu formülü

2,9 g Tris baz ve 14,5 g glisin 800 ml distile su içinde çözülmüştür. Üzerine 200 ml metanol eklenmiştir. Karıştırılıp +4°C dolaba kaldırılarak soğutulmuştur.

Transfer tamponu	1000 ml için
Tris	2,9 g
Glisin	14,5 g
Distile su	800 ml
Metanol	200 ml

2.3.9.6. Membranların Bloklanması

Transfer işlemi sonrası yıkanan membranlar %5 BSA (bovine serum albümin) içeren TBST çözeltisi bulunan kaplara alınmış ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak bloklama yapılmıştır. Bloklama işlemindeki amaç, membrana aktarılan proteinler dışındaki boşlukların kapatılmasıdır. Böylece, protein yapısında olan antikorların membranın boş kısımlarına bağlanması en aza indirgenmiş olur ve proteinlere bağlanma oranı en üst düzeye çıkarılır. Bloklama işlemi tamamlanan membran TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 3 kez 10'ar dakika boyunca yıkanmıştır.

2.3.9.7. Primer Antikor Uygulaması

Çalışılan proteine göre uygun olan bir primer antikor seçilmiş ve literatür bilgisi ışığında uygun olan dilüsyonu hazırlanmıştır. Antikor çözeltileri %5 BSA içeren TBST çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Membranlar küçük poşetler içine

konularak üst yüzeyine primer antikor (Çizelge 2.12) uygulanıp poşetlerin ağzı kapatılmıştır. +4°C’de bütün gece çalkalanmıştır. Ertesi gün membranlar alınıp TBST ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 3 kez 10’ar dakika boyunca yıkanmıştır.

Çizelge 2.12. Primer antikorlar ve dilüsyonları

Primer antikor	Dilüsyon
α -tubulin	1/5000
SERCA2a	1/2000
GRP-78	1/2000
β_3 -AR	1/500
eNOS	1/500
PLN	1/2000
p-PLN (PLN ^{ser16/thr17})	1/2000

2.3.9.8. Sekonder Antikor Uygulaması

Çalışılan proteine göre uygun olan bir sekonder antikor seçilmiş ve literatür bilgisi ışığında uygun olan dilüsyonu hazırlanmıştır. Antikor çözeltileri %5 BSA içeren TBST çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Membranlar küçük poşetler içine konularak üst yüzeyine sekonder antikor (Çizelge 2.13) uygulanıp poşetlerin ağzı kapatılmıştır. +4°C’de 90 dakika çalkalanmıştır. Bu sürenin sonunda membranlar alınıp TBST ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 3 kez 10’ar dakika boyunca yıkanmıştır.

Çizelge 2.13. Sekonder antikorlar ve dilüsyonları

Sekonder antikor (Antirabbit)	Dilüsyon
α -tubulin	1/4000-1/5000
SERCA2a	1/2000-1/4000
GRP-78	1/4000
β_3 -AR	1/4000
eNOS	1/4000
PLN	1/4000
p-PLN(PLN ^{ser16/thr17})	1/4000

2.3.9.9. ECL uygulaması

Reaktif A ve B'nin 1:1 karışımı ile taze hazırlanan ECL çözeltisi (her membran için yaklaşık 2 ml) yıkanan membranın üzerine eklenmiş ve 1 dakika boyunca membran ile muamele edilmiştir. Bu çözelti ışıktaki bozulduğu için hem çözeltinin hazırlanması hem de membrana uygulanması karanlıkta yapılmaktadır. ECL uygulanmasını takiben, vakit kaybetmeden görüntüleme yapılmıştır.

2.3.9.10. Görüntüleme

ECL uygulanan membran kasetin içine konularak kırmızı ışık altındaki odada röntgen filmine basılmıştır. Basma süresi (pozlama) bakılan proteine göre 1 sn ile 30 dakika arasında değişkenlik göstermiştir. Pozlamadan sonra, film öncelikle geliştirme (*developer*) çözeltisinde 2-3 dakika tutulmuş, ardından saptama/sabitleme (*fixer*) çözeltisinde 1 dakika tutulmuştur. Sonrasında film su ile yıkanarak kurutulmuştur.

2.3.9.11. Stripleme

Birincil ve ikincil antikor uygulaması yapılmış bir membranda tekrar farklı bir proteine ait bir antikor ile çalışabilmek için stripleme işlemi yapılarak, antikor ve diğer maddelerin membran yüzeyinden sökülmesi sağlanmıştır. Bu amaçla ECL uygulanmış membran TBST ile yıkanıp, küçük bir poşet içine alınıp üzerine stripleme tamponu eklenmiştir. Poşetin ağzı kapatılıp 37°C'lik etüvde 30 dakika (her 10 dakikada bir çalkalanarak) tutulmuştur. Sonrasında TBST ile 3 kez 10'ar dakika yıkanıp, bloklama ve sonrası diğer işlemler tekrarlanmıştır.

2.3.9.12. Hesaplamalar

Röntgen filminde elde edilen protein görüntüleri tarayıcıda taranıp bilgisayara aktarılmıştır. Her bir numuneye ait bantların yoğunluğu ve yüzdesi ImageJ programı ile hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Microsoft Excel'de açılan bir dosyaya kaydedilmiştir. Bantların yoğunluğunun yüzdesi α -tubulin yüzdesine oranlanarak % rölatif yoğunluk hesaplanmıştır. Hesaplanan % rölatif yoğunluklar istatistik analiz için kullanılmıştır.

2.3.10. İstatistiksel Analiz

Deneyler sonucunda elde edilen değerlerin istatistiksel analizi GraphPad Prism (8.3.1, USA) programı ile yapılmış olup değerler ortalama ve standart sapma ($means \pm SD$) ile ifade edilmiştir. Grupların karşılaştırması One-way ANOVA ve Bonferroni post-hoc test ile yapılmış olup, $P < 0,05$ istatistiksel anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri

3.1.1. Beden Ağırlığı

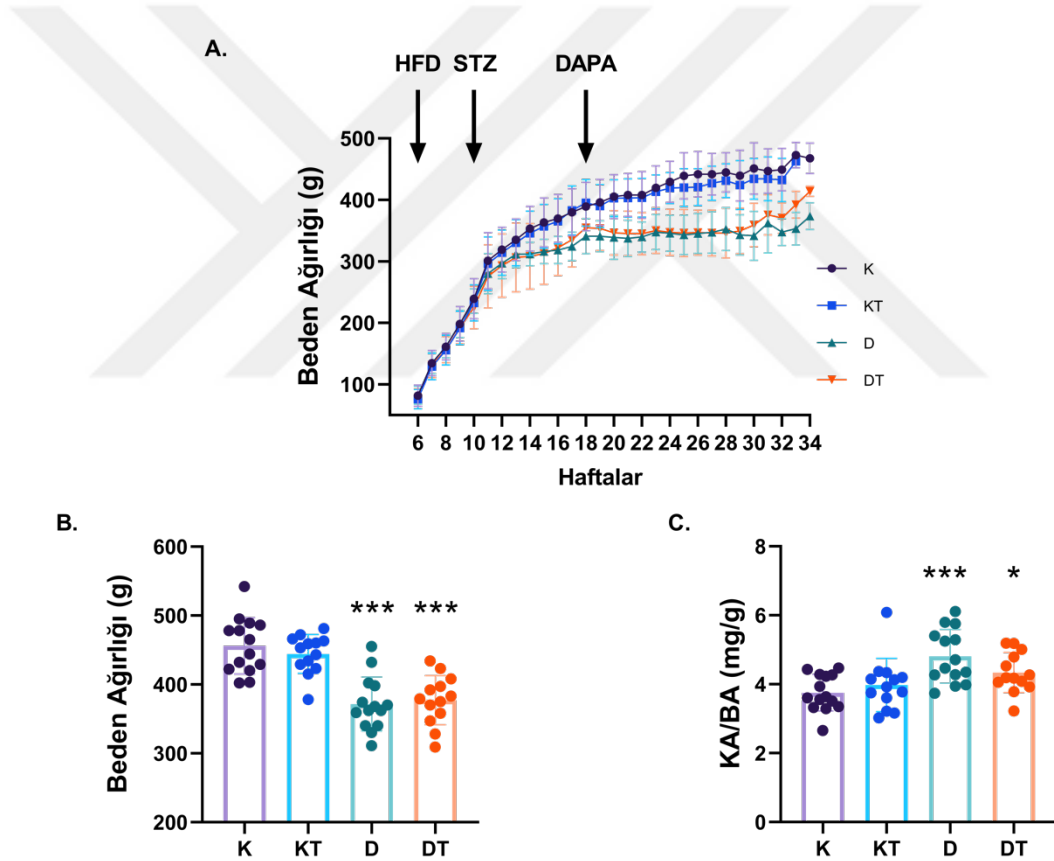
Deney hayvanlarının beden ağırlıkları haftalık olarak artış eğilimindedir. HFD ile beslenen sıçanların beden ağırlıklarında ise kontrol gruplarından farklı bir artış gözlenmemiştir. Diabetik gruplarda beden ağırlıkları ortalaması kontrol grubuna göre daha az bulunmuş, diabetik ve dapagliflozin tedavili diabetik grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmemiştir. Bunlara ek olarak, dapagliflozin tedavisinin kontrol grubunda da vücut ağırlığı üzerine bir etkisi gözlenmemiştir (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1.A ve B).

Diabetin yol açtığı kardiyovasküler komplikasyonlardan biri de kardiyak hipertrofidir. Çalışmamızda, diabetik kalpte hipertrofi olup olmadığını anlayabilmek için kalp ağırlığı (KA) beden ağırlığına (BA) oranlanarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Diabetik grupta, kalp ağırlığının beden ağırlığına oranı anlamlı bir şekilde artmıştır. Tedavi ile bu oran azalmış görünse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Öte yandan, kontrol grubu ile dapagliflozin tedavili diabetik grup arasında da istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1.C).

Çizelge 3.1. Sıçanların deney günü ölçülen değerleri.

	K (n=14)	KT (n=13)	D (n=14)	DT (n=13)
BA (g)	456,07±40,74	444,31±28,17	371,64±39,21***	377,15±35,74***
KA/BA (mg/g)	3,75±0,53	3,98±0,77	4,81±0,78***	4,34±0,58*
KŞ (mg/dl)	108,79±6,68	100,00±8,88	372,57±80,37***	155,77±38,71 ^{φφφ}

BA, beden ağırlığı; KA/BA, kalp ağırlığı/beden ağırlığı; KŞ, kan şekeri. K, kontrol grubu (n=14); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu (n=13); D, diabetik grup (n=14); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup (n=13). Değerler ortalama ± standart sapma (Ort±SD) olarak verilmiştir. *, P<0,05; ***, P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık. ^{φφφ}, P<0,001; diabetik gruba göre anlamlılık.



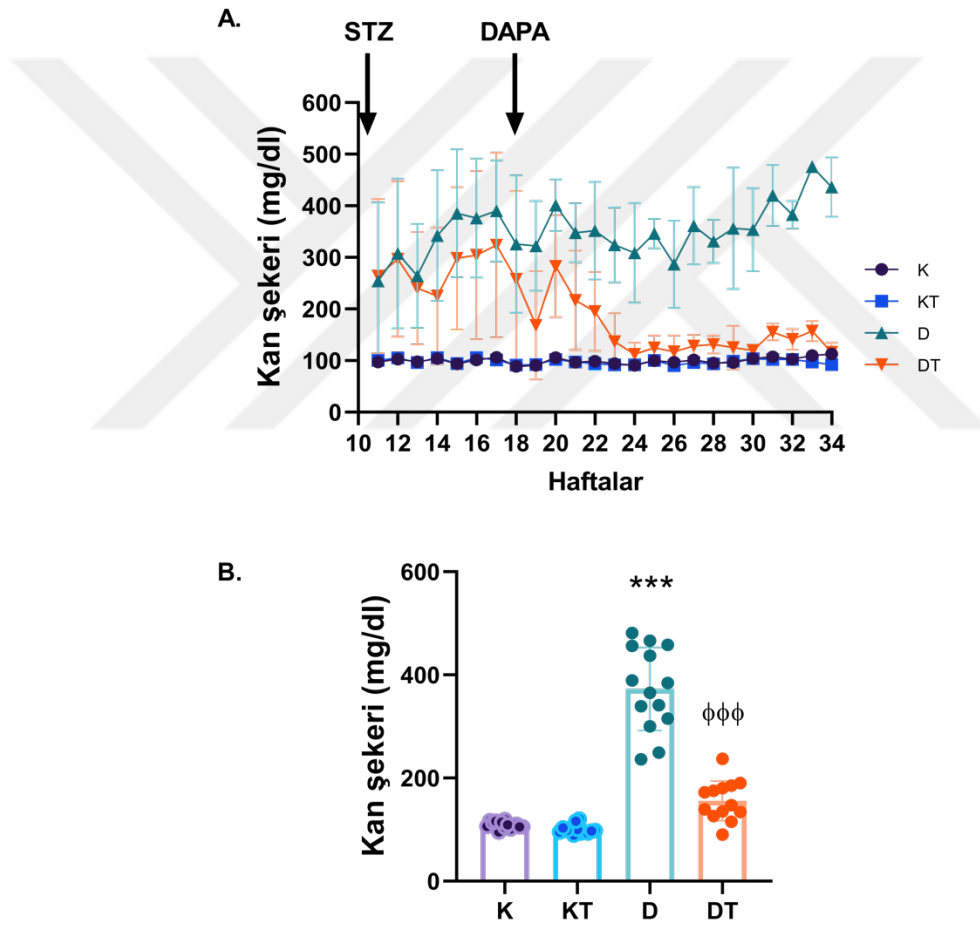
Şekil 3.1. Sıçanların beden ve kalp ağırlıkları değerlerine ait grafikler

A. Sıçanların beden ağırlıklarının haftalara göre değişim grafiği. **B.** Sıçanların deney günü ölçülen beden ağırlıklarının karşılaştırmalı grafiği. **C.** Sıçanların kalp ağırlığının beden ağırlığına oranının karşılaştırmalı grafiği (Çizelge 3.1). K, kontrol grubu (n=14); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu (n=13); D, diabetik grup (n=14); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup (n=13). *, P<0,05; ***, P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık.

3.1.2. Kan Şekeri

3.1.2.1. Haftalık Kan Şekeri

STZ injeksiyonu sonrası diabetik gruplarda kan şekeri anlamlı bir şekilde yükselmiştir. Dapagliflozin tedavisi ile diabetik sıçanların kan şekeri anlamlı bir şekilde düşerken, kontrol sıçanlarda tedavinin kan şekeri üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.2).



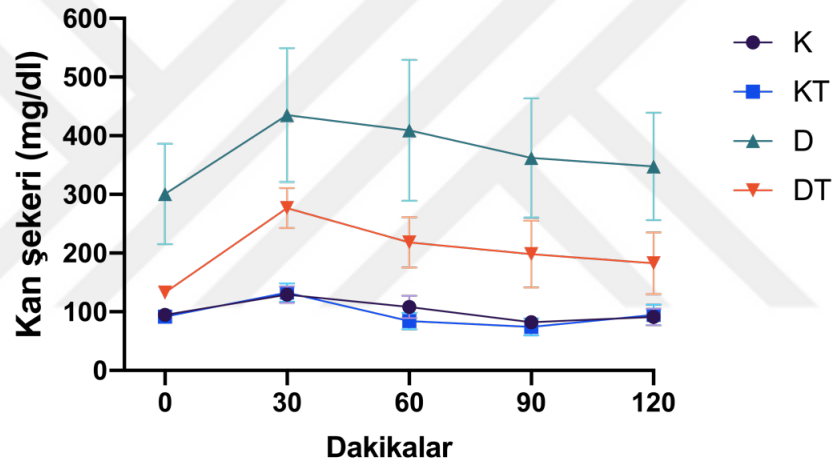
Şekil 3.2. Sıçanların kan şekeri değerlerine ait grafikler

A. Sıçanların kan şekeri değerlerinin haftalara göre değişim grafiği. **B.** Sıçanların deney günü ölçülen kan şekerlerinin karşılaştırmalı grafiği. K, kontrol grubu ($n=14$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=13$); D, diabetik grup ($n=14$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=13$). ***, $P<0,001$; kontrol grubuna göre anlamlılık. $\phi\phi\phi$, $P<0,001$; diabetik gruba göre anlamlılık.

3.1.2.2. Oral glukoz tolerans testi

12 saat aç bırakılan sıçanlara yapılan şeker yüklemesi sonrası kan şekeri düzeyi şeker yüklemesinin yapıldığı 0. dakikadan itibaren yükselmeye başlamış ve 30. dakikada en yüksek değere ulaşmıştır. Sonrasında kan şekeri değerleri tüm gruplarda düşmeye başlamıştır (Şekil 3.3 ve Çizelge 3.2).

Kan şekeri diabetik gruplarda kontrol gruplarına göre artış göstermiştir. Bu artış, dapagliflozin tedavili diabetik grupta tedavisiz diabetik gruba oranla anlamlı olarak daha azdır.



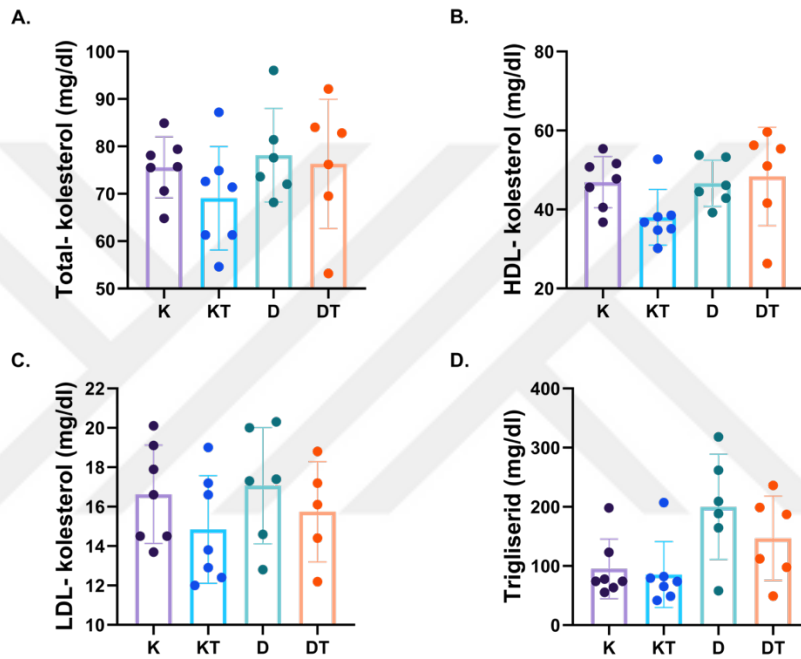
Şekil 3.3. OGTT kan şekeri değerlerinin zamana göre değişim grafiği

Çizelge 3.2. Sıçanların oral glukoz tolerans testi ile elde edilen kan şekeri değerleri. K, kontrol grubu ($n=8$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=8$); D, diabetik grup ($n=8$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=8$). ***, $P<0,001$; kontrol grubuna göre anlamlılık. ^{φφφ}, $P<0,001$; diabetik gruba göre anlamlılık.

	K ($n=8$)	KT ($n=8$)	D ($n=8$)	DT ($n=8$)
0. dk Kan şekeri (mg/dL)	95±5	92±7	301±86	133±12
30. dk Kan şekeri (mg/dL)	129±14	133±16	435±114***	277±34 ^{φφφ}
60. dk Kan şekeri (mg/dL)	108±19	84±14	409±120***	218±43 ^{φφφ}
90. dk Kan şekeri (mg/dL)	82±11	74±15	362±102***	198±57 ^{φφφ}
120. dk Kan şekeri (mg/dL)	91±14	95±17	348±92***	183±53 ^{φφφ}

3.1.3. Serum Lipid Düzeyleri

Çalışmamızda total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL- kolesterol ve trigliserid düzeyleri ölçülmüştür. Kolesterol değerleri bakımından gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 3.A-C ve Çizelge 3.3). Trigliserid düzeyleri açısından ise, HFD ile beslenen diabetik grupta kontrol grubuna göre artış görünse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.D ve Çizelge 3.3).



Şekil 3.4. Sıçanların serum lipid değerlerine ait grafikler

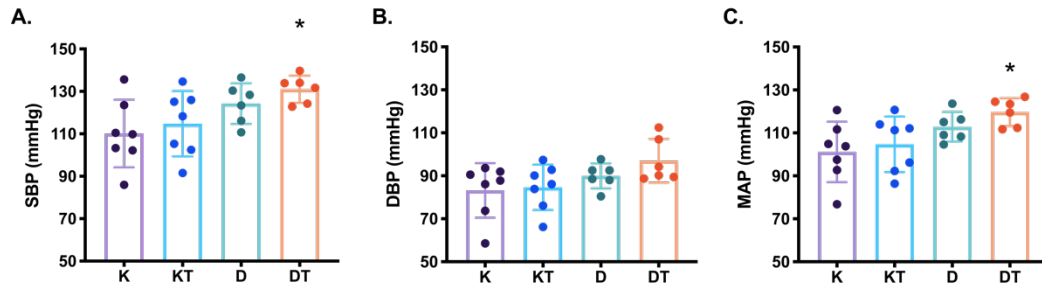
A. Total kolesterol düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği. B. HDL- kolesterol düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği. C. HDL- kolesterol düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği. D. Trigliserid düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği. K, kontrol grubu ($n=7$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=7$); D, diabetik grup ($n=6$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$).

Çizelge 3.3. Sıçanların serum lipid değerleri

	K ($n=7$)	KT ($n=7$)	D ($n=6$)	DT ($n=6$)
Kolesterol	75,57±6,44	69,04±10,88	78,13±9,87	76,3±13,65
HDL-kolesterol	46,93±6,52	38,03±7,04	46,63±5,83	48,37±12,48
LDL-kolesterol	16,63±2,50	14,84±2,73	17,07±2,95	15,74±2,55
Trigliserid	95,19±50,25	85,49±55,68	199,98±88,80	146,87±71,28

3.2. In-vivo Kalp Deneyleeri

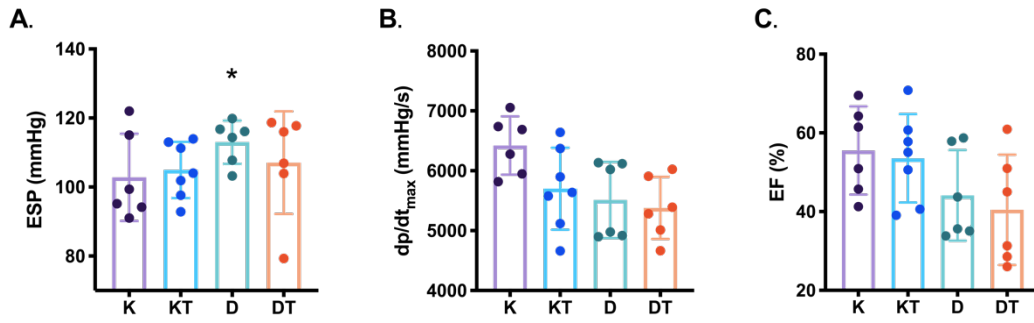
İzofluran anestezisi altındaki sıçanların karotid arterine takılan basınç-hacim kateteri yardımıyla sıçanların bazal durumdaki kan basıncı değeri ölçülmüştür (Şekil 3.5). Sıçanların sistolik kan basıncı ve ortalama kan basıncı değeri diabetik ve dapagliflozin tedavili diabetik grupta artmasına karşın, sadece tedavili diabetik gruptaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Sistolik kan basıncı (SBP), K: $110,1 \pm 15,9$; KT: $114,8 \pm 15,4$; D: $124,3 \pm 9,6$; DT: $131,1 \pm 6,4^*$; Ortalama kan basıncı (MAP), K: $101,14 \pm 14,1$; KT: $104,7 \pm 12,9$; D: $112,8 \pm 6,8$; DT: $119,7 \pm 6,4^*$; *, $P < 0,05$). Diastolik kan basıncı değeri açısından ise gruplar arası istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Diastolik kan basıncı (DBP), K: $83,2 \pm 12,7$; KT: $84,6 \pm 10,6$; D: $90,0 \pm 5,8$; DT: $97,0 \pm 10,2$).



Şekil 3.5. Sıçanların kan basınçlarının karşılaştırmalı grafikleri

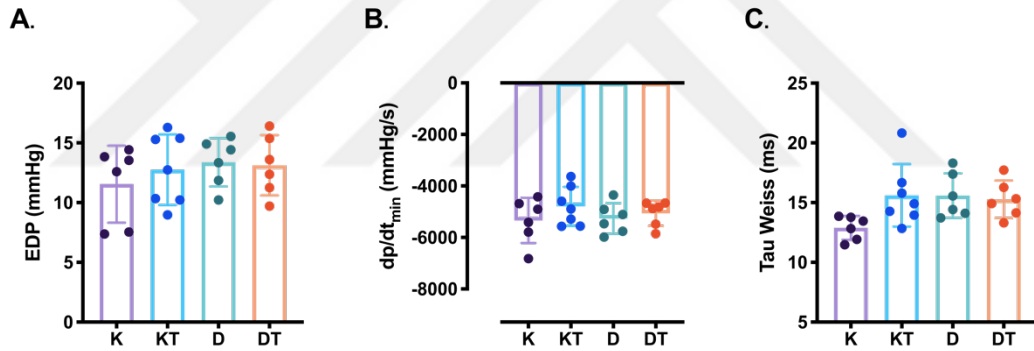
A. SBP, sistolik kan basıncı grafiği. B. DBP; diastolik kan basıncı grafiği. C. MAP, ortalama kan basıncı grafiği. K, kontrol grubu ($n=6$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=7$); D, diabetik grup ($n=6$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$). *, $P < 0,05$; kontrol grubuna göre anlamlılık.

Kateter ile elde edilen basınç-hacim grafiklerinin analizi yapılarak kalbin bazal hemodinamik parametreleri hesaplanmıştır. Kalbin sistolik fonksiyonunu gösteren parametrelerden kasılma hızı ve ejeksiyon fraksiyonu değerlerinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken, sistol sonu kan basıncının diabetik grupta anlamlı olarak arttığı ve dapagliflozin tedavili diabetik grupta ise kontrol grubuna göre değişmediği görülmektedir (Şekil 3.6 ve Çizelge 3.4).



Şekil 3.6. *In-vivo* sistolik fonksiyon parametrelerine ait grafikler
ESP, sistol sonu kan basıncı; dp/dt_{max} , kasılma hızı; EF, ejeksiyon fraksiyonu. K, kontrol ($n=6$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol ($n=7$); D, diabet ($n=6$); DT, dapagliflozin tedavili diabet ($n=6$). *, $P<0,05$; kontrol grubuna göre anlamlılık.

Buna ek olarak, kalbin diastolik fonksiyonun göstergesi olan diastol sonu kan basıncı, gevşeme hızı ve izovolumik gevşeme sabiti (Tau) parametrelerinde gruplar arası bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 3.7 ve Çizelge 3.4).



Şekil 3.7. *In vivo* diastolik fonksiyon parametrelerine ait grafikler
EDP, diastol sonu kan basıncı; dp/dt_{min} , gevşeme hızı; Tau, izovolumik gevşeme sabiti. K, kontrol grubu ($n=6$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=7$); D, diabetik grup ($n=6$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$).

Dahası; kalp atım hızı, sistol sonu hacmi, sistol sonu hacim indeksi, diastol sonu hacmi, diastol sonu hacim indeksi, atım hacmi, atım hacmi indeksi ve kardiyak debi parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.4. *In-vivo* bazal kardiyak hemodinamik parametreler

	K (n=6)	KT (n=7)	D (n=6)	DT (n=6)
HR (atım/dak)	251,9±24,2	237,3±27,7	254,1±18,3	236,8±10,0
ESP (mmHg)	102,8±12,7	104,9±8,1	113,0±6,3*	107,1±14,9
EDP (mmHg)	11,6±3,2	12,8±3,0	13,4±2,0	13,1±2,5
ESV (µl)	185,8±51,1	185,3±50,6	183,3 ±40,7	234,2±62,1
ESVindeks (µl/g.10³)	388,3±117,3	403,2±109,7	471,0±128,4	609,9±212,0
EDV (µl)	427,8±85,1	407,5±85,4	341,7±77,0	397,2±45,3
EDVindeks (µl/g.10³)	895,0±194,2	889,6±201,7	867,3±187,5	1022,5±177,9
CO (ml/dk)	61,8±22,4	53,9±24,0	46,8±18,4	38,1±12,3
CI (ml/dk.g. 10³)	129,5±47,3	117,9±55,1	116,9±40,9	96,5±27,2
SV (µl)	242,0±79,5	222,3±84,8	180,1±64,7	163,0±56,5
SVindeks (µl/g.10³)	506,8±168,8	486,4±196,4	451,2±144,7	412,6±127,7
EF (%)	55,5±11,2	53,5±11,2	44,1±11,5	40,5±14,0
dP/dt_{max} (mmHg/s)	6421,1±486,3	5700,8±684,6	5511,5±637,0	5380,0±519,5
dP/dt_{min} (mmHg/s)	-5338,9±880,1	-4792,1±757,7	-5263,5±599,8	-5060,8±492,7
Tau Weiss (ms)	12,9±1,0	15,6±2,6	15,6±1,9	15,3±1,6
Tau Logistic (ms)	20,5±1,3	20,3±2,0	21,8±2,1	22,0±2,7

HR, kalp atım hızı; ESP, sistol sonu kan basıncı; EDP, diastol sonu kan basıncı; ESV, sistol sonu hacmi; ESVI, sistol sonu hacim indeksi; EDV, diastol sonu hacmi; EDVI, diastol sonu hacim indeksi; CO, kardiyak debi; CI, kardiyak indeks; SV, atım hacmi; SVI, atım hacmi indeksi; EF, ejeksiyon fraksiyonu; dP/dt_{max}, kasılma hızı; dP/dt_{min} gevşeme hızı ve Tau, izovolumik gevşeme sabiti. Değerler ortalama± SD olarak verilmiştir. *, P<0,05; kontrol grubuna göre anlamlılık.

In-vivo basınç-hacim ilişkisi ölçümlerinde bazal hemodinamik parametre ölçümlerine ek olarak, *vena cava* üzerine 5 saniyelik basılar uygulanarak, oklüzyon yapılmış, böylece kalbin önyük (*preload*) bağımsız parametreleri incelenmiştir (Çizelge 3.5). Sistol sonu basınç-hacim ilişkisi eğrisinin eğimi, kalbin katılma (*stiffness*) durumunu yansıtan diastol sonu basınç-hacim ilişkisi eğrisinin eğimi ve kalbin önyük bağımsız atım gücü değerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 3.5. Önyük bağımsız *in-vivo* kardiyak parametreler
ESPVR, sistol sonu basınç-hacim ilişkisi eğimi; EDPVR, diastol sonu basınç-hacim ilişkisi eğimi; PRSW, önyük bağımsız atım gücü.

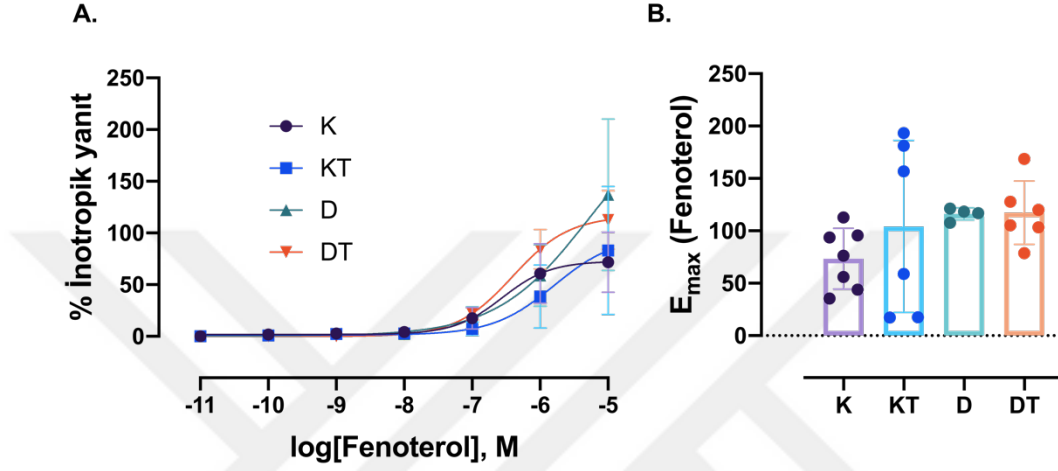
	K (n=6)	KT (n=7)	D (n=6)	DT (n=6)
ESPVR	0,341±0,130	0,387±0,152	0,360±0,257	0,313±0,175
EDPVR	0,005±0,003	0,010±0,006	0,004±0,002	0,006±0,002
PRSW (mmHg)	59,454±6,920	58,514±4,062	54,194±7,830	53,804±9,317

3.3. Papiller Kas Deneyleri

Kalbin sol ventrikülünden izole edilen papiller kasta, sırasıyla β_2 -AR agonisti fenoterol (0,1nM-10 μ M); nonselektif AR agonisti noradrenalin (0.1nM -10 μ M) (α -AR antagonisti (prazosin, 1 μ M) ve noradrenalin geri alım inhibitörü (desipramin, 10 μ M) varlığında) ve son olarak adenilat siklaz aktivatörü forskolin (3 μ M) ile konsantrasyon yanıt eğrileri elde edilmiştir.

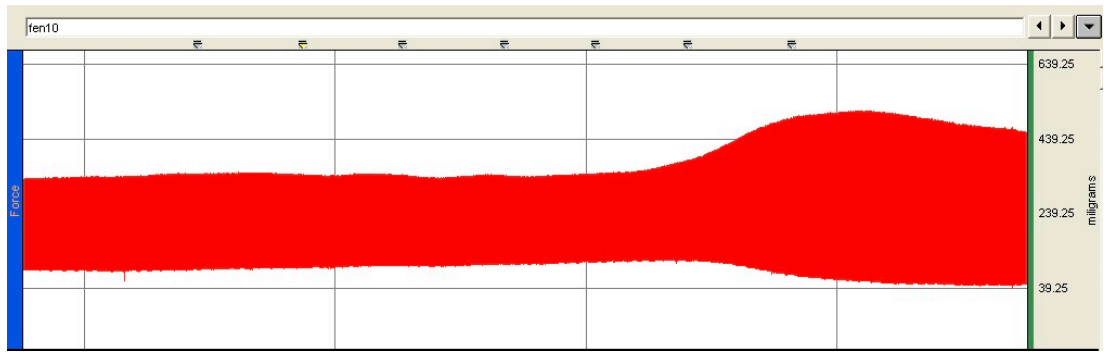
3.3.1. Fenoterol Aracılı Kasılma Yanıtı

Fenoterolün indüklediği β_2 -AR aracılı kasılma yanıtlarında gruplar arası bir farklılık gözlenmemiştir (K: %73,4±29,1; KT: %104,1±82,1; D: %116,1±5,8; DT: %117,3±30,3) (Şekil 3.8 ve 9).



Şekil 3.8. Papiller kasta fenoterol aracılı kasılma yanıtı

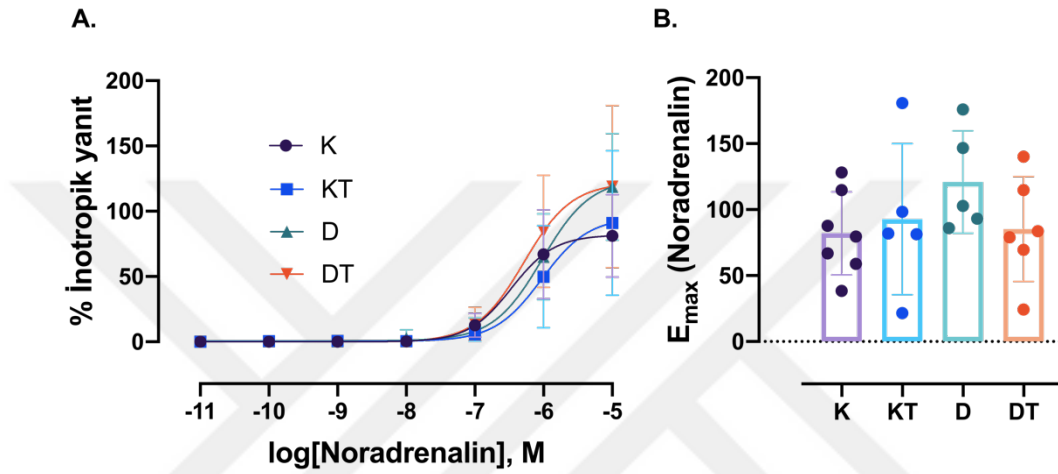
A. Fenoterol konsantrasyon yanıt eğrisi; % değişim. B. E_{max}, maksimum kasılma yanıtı. K, kontrol grubu ($n=7$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=6$); D, diabetik grup ($n=4$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$).



Şekil 3.9. Fenoterol doz yanıtı kontrol grubu örnek görüntüsü

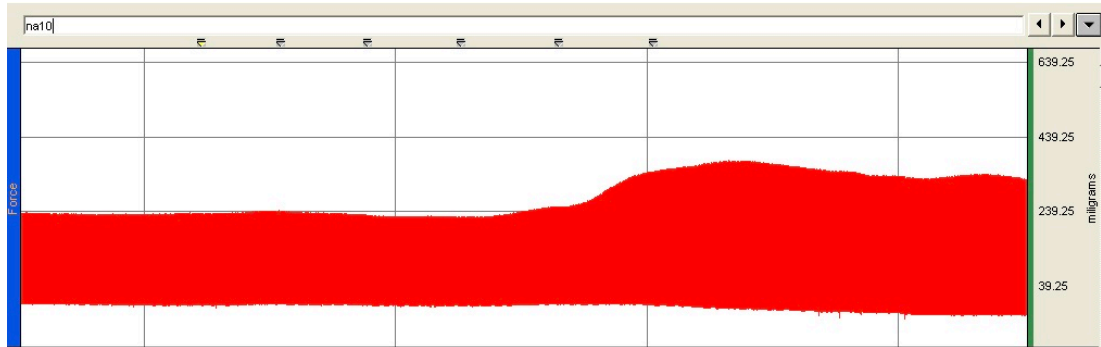
3.3.2. Noradrenalin Aracılı Kasılma Yanıtı

Noradrenalinin indüklediği β -AR aracılı kasılma yanıtları diabetik grupta diğer gruplara göre artmış görünse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (K: %82,1±31,4; KT: %92,8±57,2; D: %120,9±38,8; DT: %85,2±39,7) (Şekil 3.10 ve 11).



Şekil 3.10. Papiller kasta noradrenalin aracılı kasılma yanıtı

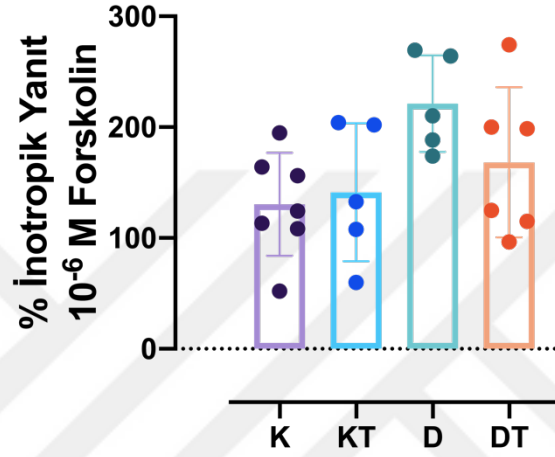
A. Noradrenalin konsantrasyon yanıt eğrisi; % değişim. B. E_{max} , maksimum kasılma yanıtı. K, kontrol grubu ($n=7$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=5$); D, diabetik grup ($n=5$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$).



Şekil 3.11. Noradrenalin doz yanıtı kontrol grubu örnek görüntüsü

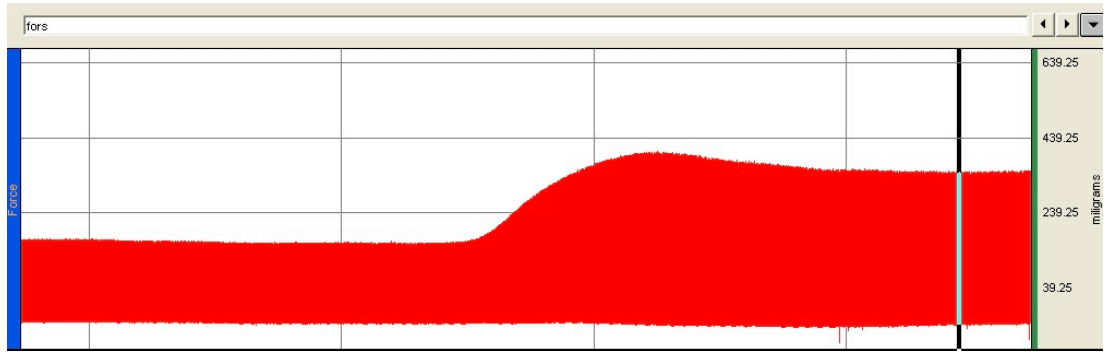
3.3.3. Forskolin Aracılı Kasılma Yanıtı

Forskolinin indüklediği kasılma yanıtları diabetik grupta diğer gruplara göre artmış görünse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (K: %130,4±46,4; KT: %141,3±62,2; D: %221,3±43,6; DT: %168,2±67,8) (Şekil 3.12 ve 13).



Şekil 3.12. Papiller kasta forskolin aracılı kasılma yanıtı

K, kontrol grubu ($n=7$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=5$); D, diabetik grup ($n=5$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$).

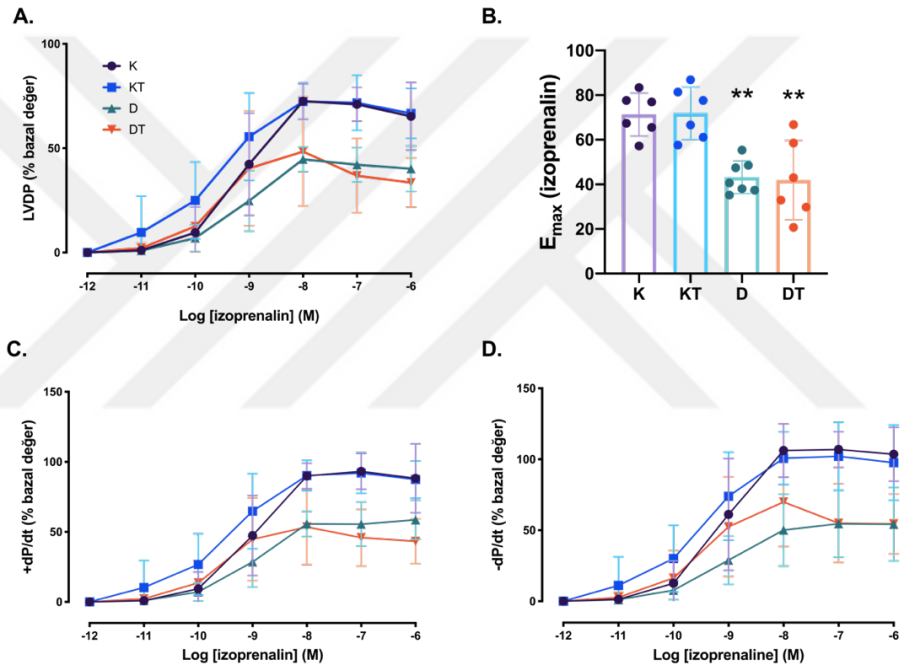


Şekil 3.13. Forskolin doz yanıtı kontrol grubu örnek görüntüsü

3.4. Langendorff Perfüze Kalp Deneyleri

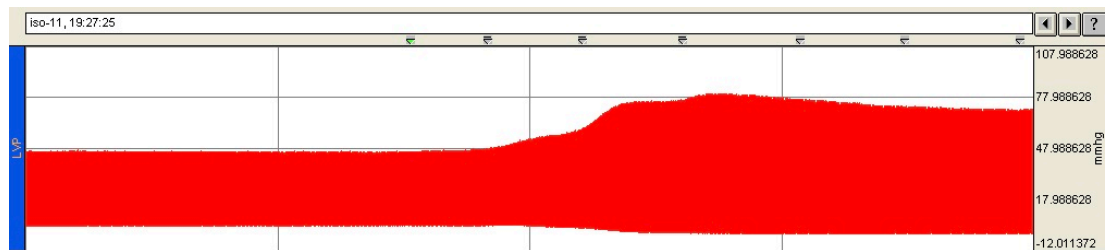
3.4.1. İzoprenalin Aracılı Kasılma Yanıtı

Nonselektif β -AR agonisti izoprenalinin artan dozlarda verilmesi ile elde edilen pozitif inotropik etki diabetik ve dapagliflozin tedavili diabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (E_{max} , K: %71,3±9,7; KT: %71,9±11,8, D: %43,2±7,4**; DT: %42,0±17,7**. **, $P<0,01$; kontrol grubuna göre anlamlılık) (Şekil 3.14 ve 15).



Şekil 3.14. Langendorff perfüze kalp sisteminde izoprenalin aracılı kasılma yanıtı

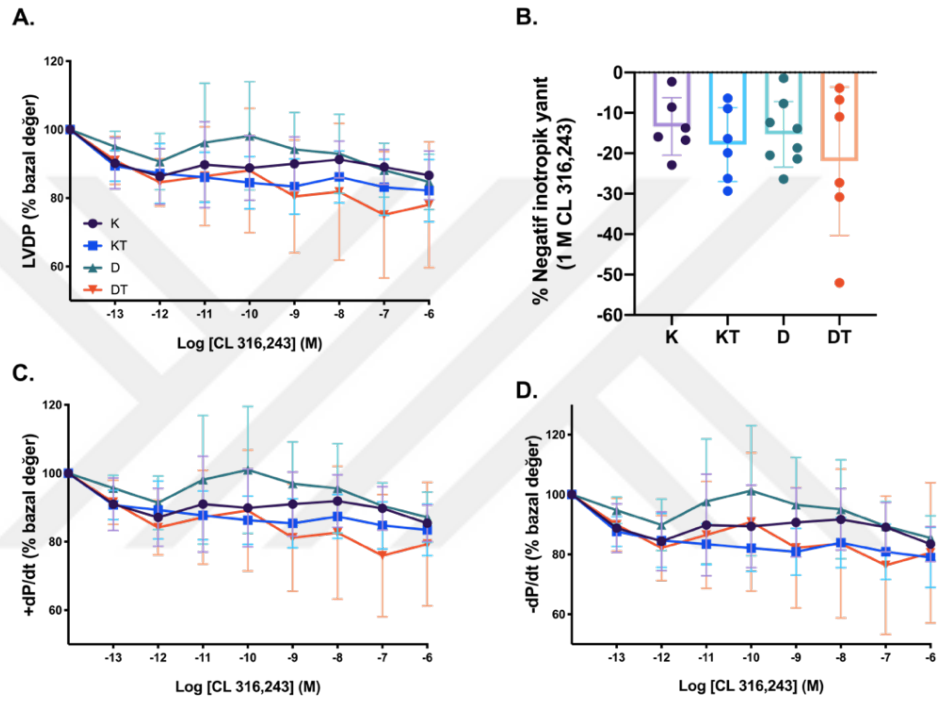
A. LVDP; sol ventrikül içi gelişen basınç. B. E_{max} , maksimum kasılma yanıtı. C. +dP/dt, kasılma yanıtı. D. -dP/dt, gevşeme yanıtı. K, kontrol grubu ($n=6$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=6$); D, diabetik grup ($n=7$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$). **, $P<0,01$; kontrol grubuna göre anlamlılık.



Şekil 3.15. İzoprenalin doz yanıtı kontrol grubu örnek görüntüsü

3.4.2. CL 316,243 Aracılı Gevşeme Yanıtı

β_3 -AR agonisti CL 316,243 ile elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrisinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir (1M CL 316,243 varlığındaki negatif inotropik yanıt, K: $-%13,4\pm7,1$; KT: $-%17,8\pm9,2$, D: $-%15,3\pm8,1$; DT: $-%21,9\pm18,4$) (Şekil 3.16 ve 17).



Şekil 3.16. Langendorff perfüze kalp sisteminde CL 316,243 aracılı gevşeme yanıtı **A.** LVDP; sol ventrikül içi gelişen basınç. **B.** 1 M CL 316,243 varlığında % negatif inotropik yanıt. **C.** +dP/dt, kasılma yanıtı. **D.** -dP/dt, gevşeme yanıtı. K, kontrol grubu ($n=6$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=6$); D, diabetik grup ($n=8$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$).



Şekil 3.17. CL 316,243 doz yanıt kontrol tedavili grup örnek görüntüsü

3.5. Western Blot Deneyleri

3.5.1. SERCA2a İfadelenme Düzeyi

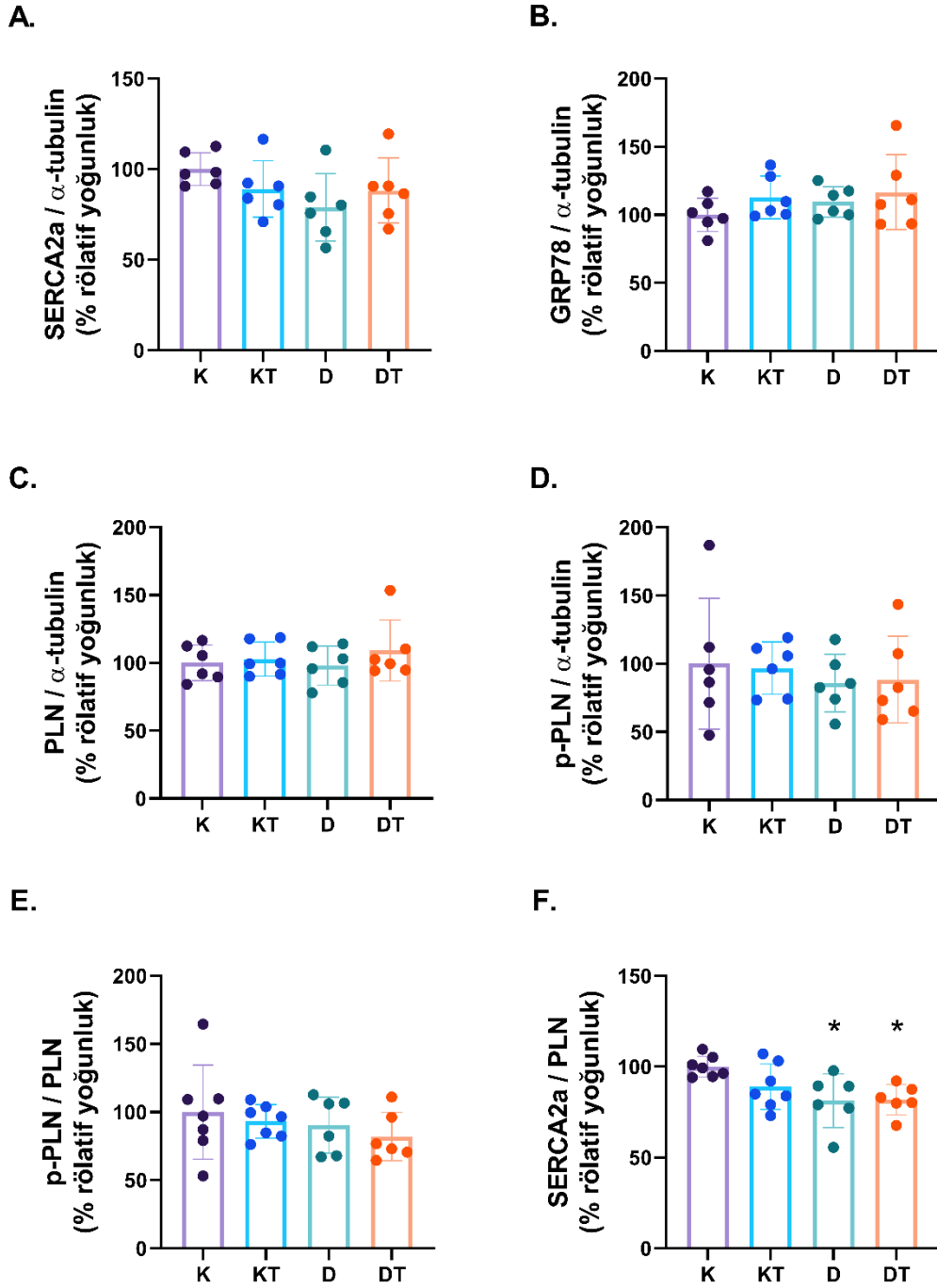
Kardiyak bozuklukların belirteçlerinden biri olan SERCA2a ifadesinde gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (K: %100,00±9,10; KT: %89,12±15,50; D: %78,88±18,57; DT: %88,23±17,94) (Şekil 3.18.A ve 19).

3.5.2. GRP78 İfadelenme Düzeyi

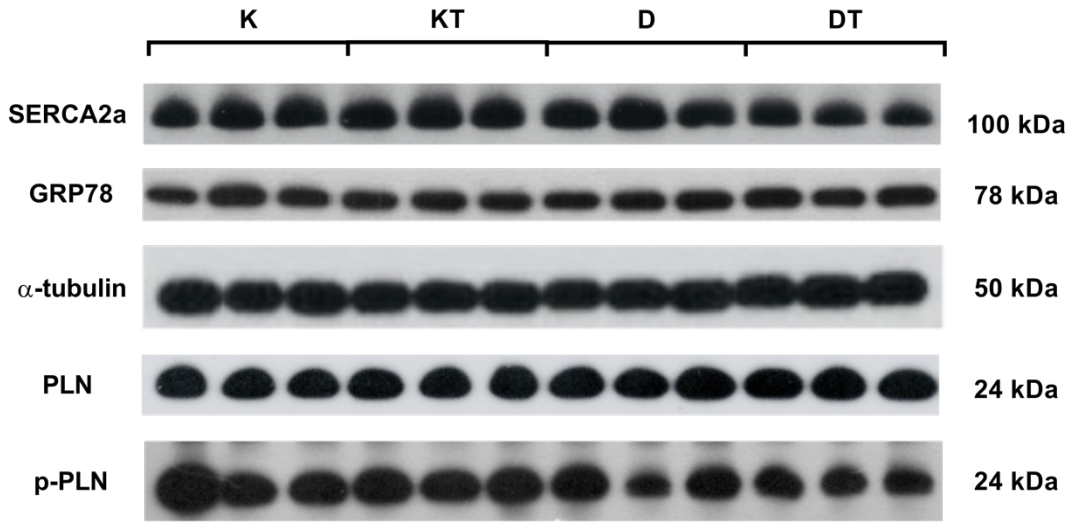
ER stres belirteci olan GRP78 protein ifadesinde gruplar arası bir farklılık bulunmamıştır (K: %100,00±12,30; KT: %112,86±15,80; D: %109,52±11,25; DT: %116,60±27,39) (Şekil 3.18.B ve 19).

3.5.3. Fosfolamban ve Fosforile Fosfolamban İfadelenme Düzeyi

SERCA2a üzerinde baskılayıcı etki gösteren PLN proteini ifadesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (K: %100,00±13,30; KT: %102,77±12,52; D: %98,01±14,41; DT: %109,13±22,47) (Şekil 3.18.C). Ayrıca, PLN'nin serin16/treonin17 fosforillenmiş şekli (p-PLN) (K: %100,00±47,89; KT: %96,67±19,21; D: %85,81±21,20; DT: %88,46±31,88) (Şekil 3.19.D) ve p-PLN/PLN oranı da gruplar arası farklılık göstermemektedir (K: %100,00±34,57; KT: %93,21±12,21; D: %90,45±20,63; DT: %82,01±17,81) (Şekil 3.18.E). Öte yandan, SERCA2a/PLN oranı diabetik ve dapagliflozin tedavili diabetik grupta kontrol grubuna göre azalmıştır (K: %100,00±5,70; KT: %89,03±12,50; D: %81,37±14,76*; DT: %81,80±8,35*. *, $P<0,05$; kontrol grubuna göre anlamlılık.) (Şekil 3.18.F ve 19).



Şekil 3.18. Kalpte pozitif inotropi ile ilişkili protein ifadeleri
A. SERCA2a protein ifadesi. **B.** GRP78 protein ifadesi. **C.** PLN protein ifadesi. **D.** P-PLN protein ifadesi. K, kontrol grubu ($n=6$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=6$); D, diabetik grup ($n=6$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$). **E.** p-PLN/PLN, fosforile fosfolambanın fosfolambana oranı. **F.** SERCA2a/PLN; Serca2a proteinin PLN'a oranı. K, $n=7$; KT, $n=7$; D, $n=6$; DT, $n=6$. *, $P<0,05$; kontrol grubuna göre anlamlılık.



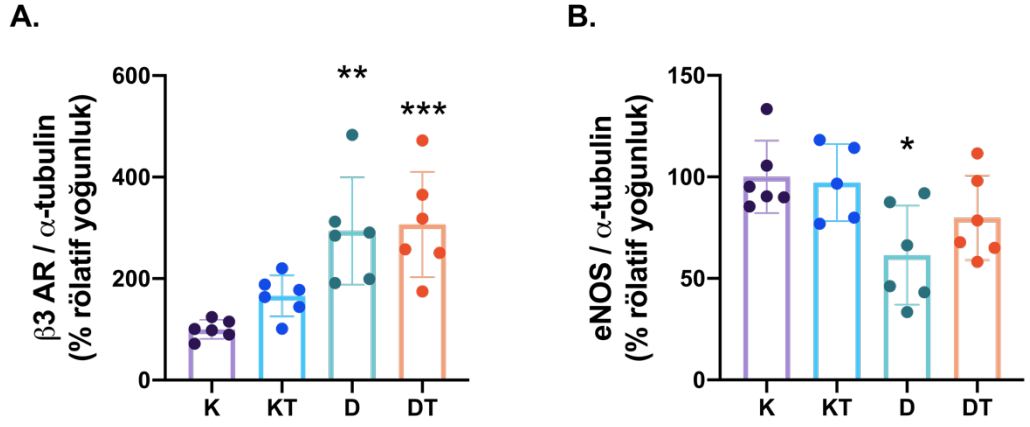
Şekil 3.19. Kalpte pozitif inotropi ile ilişkili protein ifadelerinde gruplara ilişkin örnek sinyaller

3.5.4. β_3 -Adrenerjik Reseptör İfadelenme Düzeyi

Diabetik ve dapagliflozin tedavili diabetik grupta β_3 -AR protein ifadesi kontrol ve tedavili kontrol gruba göre artmıştır. Dapagliflozin tedavisi diabette artan β_3 -AR protein ifadesini azaltmış görünse de bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (K: %100,00±18,54; KT: %165,90±40,63; D: %293,57±105,53^{**}; DT: %306,57±103,76^{***}. ^{**}, $P < 0,01$; ^{***}, $P < 0,001$; kontrol grubuna göre anlamlılık.) (Şekil 3.20.A ve 21).

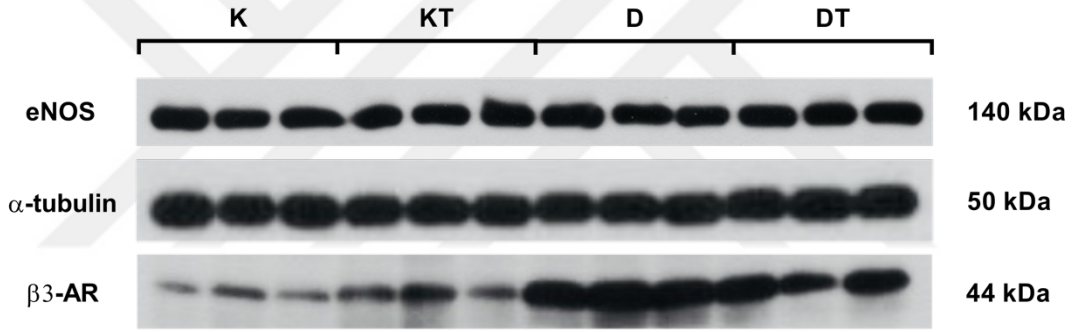
3.5.6. eNOS İfadelenme Düzeyi

eNOS protein ifadesi diabetik grupta azalmış olup diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (K: %100,00±17,76; KT: %97,24±19,99; D: %61,43±24,42^{*}; DT: %79,87±20,81. ^{*}, $P < 0,05$; kontrol grubuna göre anlamlılık.) (Şekil 3.20.B ve 21).



Şekil 3.20. Kalpte negatif inotropi ile ilişkili protein ifadeleri

A. β_3 -AR protein ifadesi. **B.** eNOS protein ifadesi. K, kontrol grubu ($n=6$); KT, dapagliflozin tedavili kontrol grubu ($n=6$); D, diabetik grup ($n=6$); DT, dapagliflozin tedavili diabetik grup ($n=6$). *, $P<0,05$; **, $P<0,01$; ***, $P<0,001$; kontrol grubuna göre anlamlılık.



Şekil 3.21. Kalpte negatif inotropi ile ilişkili protein ifadelerinde gruplara ilişkin örnek sinyaller

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda esas olarak bir SGLT2i olan dapagliflozinin HFD ve düşük doz STZ ile indüklenen diabetik sıçan kalbinde β -AR aracılı yanıtverirliği ne şekilde etkilediği araştırılmıştır. Bilindiği üzere kardiyovasküler hastalıklar diabetik morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. Bu nedenle, günümüzde diabet tedavisinde tercih edilen terapötik yaklaşım, metabolik kontrol sağlamanın yanısıra kardiyovasküler olumlu etkileri de olan bir ilaç seçmek yönündedir. Son yıllarda yapılan pek çok prelinik ve klinik çalışma SGLT2i'nin bu anlamda öne çıktığını göstermektedir (Chin ve ark., 2019; Furtado ve ark., 2019; Neal ve ark., 2017; Wiviott ve ark., 2019 ve Zinman ve ark., 2015)

SGLT2i'nin kardiyovasküler olumlu etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, bu etkilerin kalp fizyolojisinde yol açtıkları değişimler ile hemodinamik, metabolik veya hormonal etkilerle bağlantılı olabileceği öne sürülmüştür (Chin ve ark., 2019; Perreault, 2017 ve Pham ve Chilton, 2017). Öte yandan, bu ilaç grubunun kardiyak β -AR'lere etkisi bugüne kadar incelenmemiştir. Bu reseptörlerin, özellikle de β 1-AR alttipinin kardiyak kontraktilite ve inotropi üzerindeki etkisinin esansiyel olduğu düşünüldüğünde, ilacın kardiyak yararını β -AR aracılı yanıtverirliğe etkisi ile ilişkilendirmek akla yatkın görünmektedir.

Diabetik kalbin önemli bulgularından biri diastolik ve/veya sistolik fonksiyonun bozulmasıdır (Liu ve ark., 2013; Matyas ve ark., 2017; Semeniuk ve ark., 2002; Werner ve ark., 2018; Wold ve ark., 2001 ve Wu ve ark., 2018). Çalışmamızda sıçanların sistolik ve diastolik fonksiyonundaki bozulmalara işaret eden değişimler belli oranda gözlenmiş olsa da söz konusu değişimlerin hiçbiri istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Örneğin, kalbin sistolik fonksiyonunu değerlendirmemize yardımcı olan *in vivo* hemodinamik parametrelerden yalnızca sistol sonu basınç diabetik sıçanlarda anlamlı olarak artmıştır. Elde ettiğimiz bulgu, STZ diabetik sıçan modelinde yaptığımız önceki çalışmaların (Arioglu-Inan ve ark., 2013 ve Yesilyurt ve ark., 2019) sonuçları ile uyuşmasa da bu durum hayvan

modelindeki farklılığa bağlanabilir. Nitekim STZ ile indüklenen ve T1D'i taklit eden modelde azalmış sistol sonu basınç bulgusu yaygındır (Litwin ve ark., 1990 ve Radovits ve ark., 2009). Öte yandan, db/db diabetik fare modeli (Alvarez ve ark., 2004) ve obez ZDF sıçanlarla (Rosen ve ark., 1986) yapılan çalışmalarda, diabetik bireylerdeki benzer şekilde artmış sistol sonu basınç bulgusuna rastlanmaktadır. Buna ek olarak, T2D'in erken evresinde artmış LV sistolik fonksiyonunu gösteren başka deneysel sonuçlar bulunmaktadır (Baynes ve Murray, 2009; Fredersdorf ve ark., 2004 ve Habibi ve ark., 2017).

Çalışmamızda, dapagliflozin tedavisinin diastolik fonksiyon parametrelerinden hiçbirine olumlu etkisi gözlenmemiştir. Buna karşın, literatürde yer alan bazı çalışmalar bizim bulgularımızın aksine SGLT2 inhibitörlerinin in vivo diastolik fonksiyona olumlu etkilerine dikkat çekmektedir. Örneğin, leptin geni çıkarılmış ob/ob farelerde empagliflozin tedavisi ile Tau ve EDPVR gibi diastolik fonksiyona ilişkin parametrelerin iyileştiği gösterilmiştir (Hammoudi ve ark., 2017). Benzer şekilde, Zhou ve Wu bizim de kullandığımız model olan yüksek yağ ve düşük STZ diabet modelinde empagliflozin tedavisinin gevşeme hızını ve sol ventrikül diastol sonu basıncını düzelttiğini bulmuştur. Bu çalışmalarla bizim çalışmamız arasındaki farklılık seçilen SGLT2 inhibitörü ile ilişkilendirilebilir. Nitekim, empagliflozinin grubun diğer üyelerine kıyasla SGLT2'ye selektivitesinin (Ndefo ve ark., 2015) ve kardiyovasküler yararının daha yüksek olduğu (Minze ve ark., 2018) ifade edilmektedir.

Diastolik fonksiyona olumlu etkisi ortaya konan empagliflozinin sistolik fonksiyona etkisi konusunda ise farklı sonuçlar bildirilmiştir. Zhou ve Wu (2017) yüksek yağ ve düşük STZ diabet modelinde empagliflozinin sol ventrikül sistolik basıncını ve kasılma hızını iyileştirdiğini göstermiştir. Öte yandan, leptin geni çıkarılmış ob/ob (Hammoudi ve ark., 2017) ve db/db farelerde (Habibi ve ark., 2017) empagliflozin tedavisi sistolik fonksiyonu düzeltmemiştir. Bizim çalışmamızda ise, sistolik fonksiyona ilişkin parametrelerden yalnızca sistol sonu basınç artışı dapagliflozin tedavisi ile azalmıştır. Bu sonuçlar SGLT2 inhibitörlerinin diastolik

fonksiyon üzerine yararının daha dikkate değer olduğunu düşündürse de daha fazla deneysel ve klinik çalışmaya gereksinim bulunmaktadır.

Kalp fonksiyonlarının düzenlenmesinde sempatik sinir sisteminin etkilerine aracılık eden β -AR'ler önemli yer tutmaktadır (Barbier ve ark., 2007). Kardiyak β_1 - ve β_2 -AR'ler AC-cAMP-PKA yolağı üzerinden pozitif inotropik ve kronotropik etkiye aracılık etmektedir (George ve Pitt, 2006). Kalpteki bu reseptörlerin uyarılması ile kenetli oldukları G_s proteini AC-cAMP-PKA yolağı aktive olmaktadır. Böylece, L tipi Ca^{++} kanalları başta olmak üzere birçok hedef bileşen fosforile olmakta ve hücre içine Ca^{++} girişi uyarılmaktadır. Hücre içinde artan Ca^{++} konsantrasyonu, SR'den sitozole Ca^{++} çıkışını uyararak kardiyak miyofilamentlerin aktive olmasını ve kalbin kasılmasını sağlamaktadır. Kasılma sonunda PLN'in fosforilasyonu ile SERCA2a üzerindeki baskılayıcı etkinin kalkması ile Ca^{++} 'nin SERCA2a ile SR'ye geri alınmakta ve kalp gevşemektedir (Tsang ve ark., 2009).

Diabetik kalpte β -AR aracılı yanıtverirliğin azaldığı bilinmektedir (Arioglu-Inan ve ark., 2013 ve Dincer ve ark., 1998). Bu durumun patolojiye bağlı olarak reseptör ifadeleneşindeki değişimlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Diabetik kalpte β_1 -AR mRNA ve protein ifadesi anlamlı olarak azalmaktadır (Arioglu-Inan ve ark., 2013; Bidasee ve ark., 2008; Dincer ve ark., 2001; Haley ve ark., 2015 ve Matsuda ve ark., 1999). Öte yandan, β_2 -AR'lerdeki değişimin ise daha çok desensitizasyon şeklinde olduğu ifade edilmektedir (Rockman ve ark., 1998) Çalışmamızda Langendorff perfüze kalp preparatı kullanılarak β_1 - ve β_2 -AR-aracılı yanıtverirlik değerlendirilmiştir. İzoprenalin ile elde edilen kasılma yanıtı diabetik kalpte belirgin bir şekilde azalmıştır. Ne var ki, dapagliflozin tedavisinin bozulan inotropik yanıtı karşı herhangi bir iyileştirici etkisi gözlenmemiştir. Dapagliflozin tedavisi ile olumlu etki görülmemesi olasılıkla ilacın diabetik kalpte azalan reseptör dansitesini düzeltici etkisinin olmamasına bağlanabilir. Nitekim diabetik hayvan modellerinde bozulan kontraktiletiyi azalan β -AR sayısı ile ilişkilendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Dincer ve ark., 2001; Jiang ve ark., 2015 ve Savarese ve Berkowitz, 1979). Ne var ki, çalışmamızda β_1 - ve/veya β_2 -AR mRNA ya da protein ifadesindeki değişimleri

belirlemek mümkün olmamıştır. Bir başka olasılık ise, reseptörün sayısı korunsa dahi, aracılık ettiği sinyal yollarındaki bozukluklara dapagliflozinin yararsız olmasıdır. Kalpte β_1 - ve/veya β_2 -AR'lerin Gs-AC-cAMP-PKA üzerinden inotropik yanıtta yol açtığı bilinmektedir. Böylece, bu yolağın bir ya da daha fazla noktasındaki sorunun kontraktıl disfonksiyona neden olması muhtemeldir. Bu noktadan hareketle, çalışmamızda, bu sinyal kaskadı içinde yer alan cAMP komponentinin değişimi tüm gruplarda incelenmiştir. Sol ventrikül papiller kasında cAMP aktivatörü forskolin ile elde edilen kasılma yanıtları bakımından gruplar arası anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Çalışmamızda, yolaktaki diğer komponentlere ilişkin yorum yapılabilecek bir veri elde edilememiştir.

Langendorff sisteminde yapılan deneylere ek olarak, β_1 - ve β_2 -AR-aracılı yanıtverirlik sol ventrikül papiller kasında da noradrenalin ve fenoterol doz yanıt eğrileri üzerinden de incelenmiş ve gruplararası farklılık bulunmamıştır. Langendorff perfüze kalp preparatında izoprenalin ile azalan kasılma yanıtına karşılık, sol ventrikül papiller kasında noradrenalin ile ölçülen kontraktılitenin değişmemesi iki yöntem arası farklılıkla açıklanabilir. Şöyle ki, Langendorff perfüze kalp preparatında tüm kalbe ait kasılma yanıtı ölçülürken; papiller kas preparatında yalnızca sol ventrikülden izole edilen papiller kasın yanıtı gözlenmektedir. Bir başka anlatımla, papiller kas preparatı daha ziyade kalbin sol ventrikül fonksiyonunu yansıtmaktadır. Bu bilgi ışığında, çalışmamızda HFD ve düşük doz STZ ile indüklenen diabet modelinde kardiyak inotropide görülen azalmanın sol ventrikül düzeyinde belirgin olmadığı görülmektedir.

Hem sistolik hem de diastolik fonksiyon için anahtar iyon Ca^{++} 'dur. Kalpte Ca^{++} hareketlerinin düzgün işlemesi sağlıklı bir kasılma ve gevşeme için ön şarttır. Şöyle ki; β -AR aracılı sinyal yolağı uyarıldığında voltaj duyarlı L tipi Ca^{++} kanalları açılarak hücre içine Ca^{++} girer. Sitolde artan Ca^{++} düzeyi ise SR'den Ry kanalları üzerinden Ca^{++} çıkışını uyarır (CIRC, Ca^{++} aracılı Ca^{++} salıverilmesi). Miyofilamentlerin kasılmasını tetikleyen ise bu Ca^{++} 'dur. Öte yandan, sistol sonrası diastolün gerçekleşmesi için de sitozoldeki Ca^{++} 'un SERCA2a ile SR'ye geri

alınması gerekmektedir. SERCA2a'nın sadece gevşeme sırasında aktif olabilmesi PLN'nin inhibitör etkinliğine bağlıdır. Dolayısıyla, Ca⁺⁺ aracılı olaylarda rolü olan L tipi Ca⁺⁺ kanalları, Ry kanalları, SERCA2a ve PLN gibi bileşenlerin diabet patolojisine bağlı değişimleri kalbin hem sistolik/diastolik fonksiyonunu hem de β -AR aracılı yanıtverirliğini etkilemektedir. Bu noktadan hareketle, çalışmamızda SERCA2a ve PLN protein düzeyleri incelenmiştir. SERCA2a da diabete bağlı belli oranda azalma izlenmekle birlikte, bu sonuç istatistiksel anlamlı bulunmamıştır.

Öte yandan, kalbin kontraktilitesinin önemli belirteçlerinden biri olarak kabul edilen SERCA2a/PLN oranı (Koss ve Kranias, 1996) diabette anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgunun diabetik kalpte bozulduğunu gösterdiğimiz izoprenalin aracılı kasılma yanıtına katkıda bulunduğunu öne sürmek akılcı görünmektedir. Nitekim bu oranın anlamlı olarak düşük bulunduğu dapagliflozin tedavili diabetik grupta izoprenalin aracılı yanıtın da düzelmemiş olması bu hipotezimizi doğrulamaktadır. Öte yandan, diabetik fare modellerinde azalan SERCA2a aktivitesinin empagliflozin (Hammoudi ve ark., 2017) ve dapagliflozin (Joubert ve ark., 2017) tedavisi ile arttığı ve LV diastolik fonksiyonun düzeldiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda, kalpteki β_1 - ve β_2 -AR'ye ek olarak β_3 -AR alt tipinin de dapagliflozin tedavisi ile ilişkisi incelenmiştir. Langendorff perfüze kalp preparatında selektif β_3 -AR agonisti CL 316,243 ile negatif inotropik etki değerlendirilmiştir. β_3 -AR aracılı gevşeme yanıtlarının gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmediği gözlenmiştir. Bu bulgu, STZ ile indüklenen ve T1D modeline yakın diabetik sıçanlarda elde ettiğimiz önceki bulgularımızla örtüşmemektedir. Nitekim, STZ diabet modelinde β_3 -AR aracılı gevşeme yanıtı kontrol grubuna oranla anlamlı olarak artmıştır (Kayki-Mutlu ve ark., 2014 ve Uyar-Boztaş ve ark., 2017).

Bu durum çalışılan deneysel model farklılığı ile ilişkilendirilebilir. Nitekim çalışmamızda uyguladığımız diabet modeli HFD+düşük doz STZ modelidir ve klinikte karşılaşılan T2D modeline benzerlik göstermektedir. Öte yandan, T2D'nin

taklit edildiği HFD ve yüksek sukroz ile beslenen fare modelinde BRL37344 ile stimüle edilen β_3 -AR aracılı gevşeme yanıtının oluşmadığı (Baynes ve Murray, 2009), HFD+ düşük doz STZ ile indüklenen diabet modelinde ise gevşeme yanıtında bir değişiklik olmadığı (Derkach ve ark., 2014) bildirilmiştir. Fonksiyonel yanıtta bu çelişkinin tersine, sol ventrikülde ölçtüğümüz β_3 -AR protein ifadesi STZ diabetik modeldeki hem bizim hem de diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumludur (Amour ve ark., 2007; Amour ve ark., 2008; Arioglu-Inan ve ark., 2013; Bidasee ve ark., 2008 ve Dincer ve ark., 2001). Ne var ki, HFD+düşük doz STZ modeli (Haley ve ark., 2015) ve ZDF model (Jiang ve ark., 2015) sıçanlarla yapılan çalışmalarda β_3 -AR protein ifadesinde değişim bildirilmemiştir. Bulgularımız β_3 -AR protein ifadesinin diabetik gruplarda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak arttığını ortaya koymaktadır. Öte yandan, dapagliflozin tedavisi ile bu artış bir miktar azalmış, ancak anlamlı bir düzeye ulaşmamıştır. Protein ifadesindeki artışın fonksiyonel yanıtı yansımaması çelişkili görünmekle birlikte, literatürde benzer sonuçlar yer almaktadır. Örneğin; Moniotte ve ark. (2001), kalp yetmezlikli sıçanlarda papiller kasta β_3 -AR protein ifadesinin arttığını, buna karşılık β_3 -AR aracılı negatif inotropinin azaldığını bildirmiştir. Araştırmacılar, bu durumu postreseptör olaylardaki açıklamaya çalışmış ve azalmış eNOS ifadesinin etkenlerden biri olabileceğini öne sürmüştür. Bu açıklama mantıklı görünmektedir, nitekim eNOS β_3 -AR aracılı sinyal yolağının önemli bir bileşenidir. Çalışmamızda, eNOS ifadesi diabetik kalpte azalmış bulunmuş, tedavi sonrası ise anlamlı olmasa da kontrol düzeyine yaklaşmıştır. eNOS aktivasyonun göstergesi olan enzimin serin¹¹⁷⁷/treonin⁴⁹⁵ fosforile şeklinin ifadesi ise ne yazık ki ölçülemedi. Bu nedenle, diabetik kalpte artan reseptör ve azalan eNOS enzim ifadelerine karşılık değişmeyen β_3 -AR aracılı negatif inotropiyi yorumlamak için gelecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; çalışmamızın bulguları dapagliflozin tedavisinin HFD ve düşük doz STZ ile oluşturulan diabet modelinde sistolik/diastolik kalp fonksiyonu veya kardiyak beta adrenerjik yanıtverirlik üzerine etkisinin minör olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular SGLT2i'lerin metabolik faydalarına ek olarak diabetik kardiyak komplikasyonlarda da yararlı olabileceği iddiası ile örtüşmesine de çalışılan

diabet modelinin/süresinin, seçilen ilacın ve ilaç dozunun/tedavi süresinin de sonuçlara katkısı da göz önüne alınmalıdır. Nitekim grubun diğer bir üyesi olan empagliflozin ile yapılan prelinik ve klinik çalışmaların sonuçları bu ilacın kardiyak olumlu etkisine işaret etmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

HFD ve düşük doz STZ injeksiyonu ile oluşturulan 18-21 haftalık diabet modelinde gelişen kardiyak komplikasyonlara bir SGLT2i olan dapagliflozinin etkisi incelediğimiz çalışmamızın sonuçları aşağıda özetlenmektedir:

Tedavi ile başarılı bir kan şekeri regülasyonu sağlanmıştır. Ne var ki, beden ağırlığında gözlenen azalma tedavi ile düzeltilememiştir. Aslında, HFD diyet ve düşük doz STZ ile oluşturulan diabet modeli T2D'ye benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, bu hayvanlarda kilo kaybı olması beklenmemektedir. Nitekim beden ağırlığının azalması yüksek doz STZ ile oluşturulan T1D'ye yakın modeline başlıca bulgusudur. Bu durum, modelimizin uygunluğu konusunda şüpheye yol açsa da benzer şekilde bu modelde kilo kaybı bulgusuna sahip çalışmalar literatürde yer almaktadır (Albersen ve ark., 2011; Ding ve ark., 2015; Gaikwad ve ark., 2010; Haley ve ark., 2015; Thackeray ve ark., 2011 ve Xie ve ark., 2011). Dahası, TG düzeyi diabetik grupta artmış olarak görünse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ne var ki, insülin düzeyleri ölçülememiştir.

Çalışmamızda, sistolik ve diastolik kalp fonksiyonlarını gösteren birçok hemodinamik parametrenin diabete bağlı olarak anlamlı olarak değişmediği görülmektedir. Bununla birlikte, sistol sonu basıncı diabetik grupta artmış ve dapagliflozin tedavisi ile bu parametre kontrol değerine yaklaşmıştır.

Langendorff kalp preparatlarından elde edilen izoprenalin yanıtları, diabette azaldığı bilinen β_1 - ve β_2 -AR aracılı kasılma yanıtlarını doğrulamıştır. Ne var ki, papiller kas deneylerinde elde edilen β_1 -AR aracılı yanıtlarda gruplar arası bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte, β_2 -AR yanıtverirliklerinde de gruplar arasında fark bulunamamıştır. Öte yandan, Langendorff kalp preparatı yardımıyla kalpteki β_3 -AR aracılı gevşeme yanıtları da değerlendirilmiş olup β_3 -AR yanıtverirliğinin değişmemiş olduğu bulunmuştur. β_3 -AR protein düzeylerinin ise

diabetik kalpte arttığı gözlenmiştir. Bu bulgunun aksine, β_3 -AR aracılı sinyal yolağının en önemli bileşenlerinden biri olan eNOS enzimi, diabetik grupta azalmıştır. Bunlara ek olarak, dapagliflozin tedavisi diabete bağlı β_1 -AR aracılı inotropik yanıtta ve eNOS protein ifadesindeki azalmayı bir miktar düzeltmiştir.

Diastolik fonksiyon göstergelerinden biri olan, aynı zamanda beta adrenerjik yanıtverilikte de rolü olan SERCA2a ve PLN protein ifadenmesinde ve p-PLN/PLN oranında gruplar arası bir fark bulunmamış; SERCA2a/PLN oranının ise diabetik grupta azaldığı görülmüştür. Ne var ki, dapagliflozin tedavisinin bu azalmaya bir etkisi olmamıştır.

Çalışmamızda, ciddi kardiyak komplikasyon görülmemesi diabetik modelin uygunluğu konusunda sorular akla getirirse de genel olarak diabetik sıçan modellerinde makrovasküler komplikasyonlardan çok mikrovasküler komplikasyonların daha sık görüldüğü gözden kaçırılmamalıdır. Örneğin; insüline dirençli, hiperlipemik ve hiperinsülinemik olan ZFD sıçanlarda diabetin erken başlangıcına rağmen (~10 haftalık), ateroskleroz veya makrovasküler komplikasyonlar gelişmediği için, bu model daha çok diabetik mikrovasküler komplikasyonlara çeşitli ilaçların etkisinin test edilmesi amacıyla kullanılmıştır (Heinonen ve ark., 2015).

Çalışmamızın bulguları dapagliflozin tedavisinin HFD ve düşük doz STZ diabet modelinde kardiyak fonksiyona majör bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu durum SGLT2i lerinin diabetik kardiyak komplikasyonlara karşı öne sürüldüğü gibi fazladan yararı olmamasının bir kanıtı olabilir. Öte yandan, bu eksiklik grubun seçilen üyesinden de kaynaklanabilir. Nitekim grubun bir diğer üyesi olan empagliflozin klinik çalışmalarda birçok olumlu çıktı ile ilişkilendirilmektedir. Empagliflozin gibi klinik yararı gösterilmiş bir SGLT2i ile karşılaştırmalı olarak yapılacak yeni çalışmalarla dapagliflozin tedavisinin diabetik kalpte olası yararı daha iyi anlaşılabilir. Aynı zamanda, tedavide grubun hangi üyesini seçmenin daha akıllıca olacağı değerlendirilebilir.

ÖZET

Sodyum glukoz kotransporter 2 inhibitörü dapagliflozinin tip 2 diabetik ratlarda kardiyovasküler komplikasyonlar üzerindeki etkileri

Diabetes mellitus dünya çapında 460 milyondan fazla hastayı etkilemektedir ve kardiyovasküler komplikasyon kaynaklı mortalite ile yakından ilişkilidir. Bu komplikasyonların ortaya çıkmasında beta adrenerejik reseptör yanıtverirliğindeki bozukluklar önemli rol oynamaktadır. Öte yandan, diabete bağlı kardiyovasküler komplikasyonların önlenmesi için ön koşul glisemik kontroldür. Sodyum glukoz kotransporter 2 (SGLT2) inhibitörleri, diğer antidiabetik ilaçlardan farklı olarak kardiyovasküler faydaları olduğu öne sürülen yeni bir antidiabetik ilaç sınıfıdır. SGLT2 inhibitörlerinin kardiyovasküler hastalıklara sahip diabetik hastalarda kardiyovasküler nedenlerden kaynaklanan ölüm oranını, tüm nedenlerden kaynaklı ölüm oranını ve kalp yetmezliği nedeniyle hastanede yatış oranını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. SGLT2 inhibitörlerinin bu sistemik olumlu etkileri hemodinamik etkiler ve metabolik etkiler ile açıklanmaya çalışılmıştır. Ne var ki, kardiyovasküler komplikasyonlar üzerine koruyucu etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Çalışmamızda, bu noktadan yola çıkarak, bir SGLT2 inhibitörü olan dapagliflozinin tip 2 diabetik sıçanlardaki kardiyovasküler komplikasyonlara etkisinin beta adrenerejik reseptör yanıtları üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, 6 haftalık Sprague-Dawley sıçanlar ile çalışılmıştır. Sıçanlar kontrol, dapagliflozin tedavili kontrol, diabetik ve dapagliflozin tedavili diabetik olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Diabet yüksek yağ diyeti (%35 yağ g/g) ve düşük doz STZ (25 mg/kg, i.p.) ile indüklenmiştir. Diabet ve kontrol grubunun bir kısmı 12-15 hafta boyunca dapagliflozin (1 mg/kg/gün, oral) almıştır. Tedavi bitiminde, hemodinamik parametreler *in-vivo* basınç hacim kateteri yardımıyla ölçülmüştür. Ardından, *in-vitro* olarak hem Langendorf kalp preparatında hem de papiller kasta beta adrenoseptör yanıtverirliği incelenmiştir. Son olarak, beta adrenoseptör sinyal yolağında yer alan çeşitli proteinlerin ifadeleri western blot deneyleri ile ölçülmüştür. Elde edilen değerlerin istatistiksel analizi GraphPad Prism ile yapılmış, değerler ortalama ve standart sapma ile ifade edilmiştir. Grupların karşılaştırması One-way ANOVA ve Bonferroni post-hoc test ile yapılmış, $P<0,05$ istatistiksel anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

Sonuç olarak, dapagliflozin tedavisinin diabette artan kan şekerini düşürdüğü görülmüştür. Dapagliflozin tedavisi HFD ve düşük doz STZ diabet modelinde kardiyak parametrelerin çoğuna etkisiz kalmıştır. Bu parametrelerden yalnızca bozulan sistol sonu basıncı ve β_1 -AR aracılı kasılma yanıtı, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, dapagliflozin tedavisi ile belli oranda düzelmiştir. Bu bulgular, dapagliflozin tedavisinin diabetik kalpte olumlu bir etkisinin olup olmadığını anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Beta adrenoseptörler, dapagliflozin, kalp, SGLT2 inhibitörleri, tip 2 diabet.

SUMMARY

The effects of dapagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, on cardiovascular complications in type 2 diabetic rats

Diabetes mellitus currently affects over 460 million patients worldwide and is associated with many deaths from cardiovascular complications. Impaired beta-adrenergic responsiveness plays an important role on these complications. On the other hand, glycemic control is essential to prevent the diabetic cardiovascular complications. Different from the other antidiabetic drugs, sodium glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2is) are a novel class of antidiabetic drugs with cardiovascular benefits. In many cardiovascular outcome trials, SGLT2is have significantly decreased the mortality rate related to cardiovascular causes, the all-causes mortality rate and the rate of hospitalization due to heart failure in diabetic patients with established cardiovascular diseases. These beneficial effects of the group have been related to hemodynamic and metabolic actions. However, the direct mechanisms are not fully understood. From this point of view, in the present study we aimed to investigate the effects of dapagliflozin, a SGLT2 inhibitor, on cardiovascular complications in an experimental model of type 2 diabetes in terms of beta-adrenergic receptors responsiveness.

With this purpose, 6-week-old male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups; control, dapagliflozin treated control, diabetic and dapagliflozin treated diabetic group. Diabetes was induced by high-fat diet (35% fat w/w) and low dose streptozotocin injection (25 mg/kg, i.p.). Some of the diabetic and control rats were treated with dapagliflozin (1 mg/kg/day, orally) for 12-15 weeks. After the treatment, *in-vivo* hemodynamic parameters are measured by PV catheter, and then *in-vitro* beta-adrenergic responsiveness was evaluated by using both Langendorff heart preparation and papillary muscle strips. Finally, expressions of proteins playing a role in beta-adrenergic signaling were determined by western blot experiments. All data analyzed using GraphPad Prism and expressed as means±SD. Multiple comparisons were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test and $P < 0.05$ was considered for significance.

As a result, the treatment of dapagliflozin reduced blood glucose levels in diabetic group. Dapagliflozin was ineffective on most of the cardiac parameters in HFD/low dose STZ diabetes model. Among them, only impaired end systolic pressure and β_1 -AR-mediated contraction was ameliorated to some extent. These findings demonstrate that future studies are needed to reveal whether dapagliflozin has a positive effect on the diabetic heart.

Keywords: Beta adrenoceptors, dapagliflozin, heart, SGLT2 inhibitors, type 2 diabetes.

KAYNAKLAR

- ABACI A (2011). Kardiyovasküler risk faktörlerinin ülkemizdeki durumu. *Türk Kardiyol Dern Arş*, **39**: 1-5.
- ABDUL-GHANI MA, DEFRONZO RA (2008). Inhibition of renal glucose reabsorption: a novel strategy for achieving glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Endocr Pract*, **14(6)**: 782-790. doi:10.4158/EP.14.6.782
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **33 Suppl 1**: S62-69. doi:10.2337/dc10-S062
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **37 Suppl 1**: S81-90. doi:10.2337/dc14-S081
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2018). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*, **41(Suppl 1)**: S13-S27. doi:10.2337/dc18-S002
- AHLQUIST RP (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, **153(3)**: 586-600. doi:10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586
- ALBERSEN M, LIN G, FANDEL TM, ZHANG H, QIU X, LIN CS, LUE TF (2011). Functional, metabolic, and morphologic characteristics of a novel rat model of type 2 diabetes-associated erectile dysfunction. *Urology*, **78(2)**: 476 e471-478. doi:10.1016/j.urology.2011.03.024
- ALVAREZ JA, REYES M, ESCOBEDO D, FREEMAN GL, STEINHELPER ME, FELDMAN MD (2004). Enhanced left ventricular systolic function early in type 2 diabetic mice: clinical implications. *Diab Vasc Dis Res*, **1(2)**: 89-94. doi:10.3132/dvdr.2004.013
- AMOUR J, LOYER X, LE GUEN M, MABROUK N, DAVID JS, CAMORS E, CARUSIO N, VIVIEN B, ANDRIANTSITOHAINA R, HEYMES C, RIOU B (2007). Altered contractile response due to increased beta3-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology*, **107(3)**: 452-460. doi:10.1097/01.anes.0000278909.40408.24
- AMOUR J, LOYER X, MICHELET P, BIRENBAUM A, RIOU B, HEYMES C (2008). Preservation of the positive lusitropic effect of beta-adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anesth Analg*, **107(4)**: 1130-1138. doi:10.1213/ane.0b013e3181806903
- ARCH JR, AINSWORTH AT, CAWTHORNE MA, PIERCY V, SENNITT MV, THODY VE, WILSON C, WILSON S (1984). Atypical beta-adrenoceptor on brown

adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, **309(5964)**: 163-165.
doi:10.1038/309163a0

ARIOGLU-INAN E, OZAKCA I, KAYKI-MUTLU G, SEPICI-DINCEL A, ALTAN VM (2013). The role of insulin-thyroid hormone interaction on beta-adrenoceptor-mediated cardiac responses. *Eur J Pharmacol*, **718(1-3)**: 533-543.
doi:10.1016/j.ejphar.2013.06.021

ATKINS FL, DOWELL RT, LOVE S (1985). beta-Adrenergic receptors, adenylate cyclase activity, and cardiac dysfunction in the diabetic rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, **7(1)**: 66-70. doi:10.1097/00005344-198501000-00011

BAILEY CJ, GROSS JL, PIETERS A, BASTIEN A, LIST JF (2010). Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with metformin: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **375(9733)**: 2223-2233. doi:10.1016/S0140-6736(10)60407-2

BANDO YK, MUROHARA T (2014). Diabetes-related heart failure. *Circ J*, **78(3)**: 576-583.

BARBIER J, RANNOU-BEKONO F, MARCHAIS J, TANGUY S, CARRE F (2007). Alterations of beta3-adrenoceptors expression and their myocardial functional effects in physiological model of chronic exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem*, **300(1-2)**: 69-75. doi:10.1007/s11010-006-9370-9

BAYINDIR CEVIK A, OZCAN S, SATMAN I (2015). Reducing the modifiable risks of cardiovascular disease in Turkish patients with type 2 diabetes: the effectiveness of training. *Clin Nurs Res*, **24(3)**: 299-317. doi:10.1177/1054773814531288

BAYNES JW, MURRAY DB (2009). The metal chelators, trientine and citrate, inhibit the development of cardiac pathology in the Zucker diabetic rat. *Exp Diabetes Res*, **2009**: 696378. doi:10.1155/2009/696378

BERSOFF-MATCHA SJ, CHAMBERLAIN C, CAO C, KORTEPETER C, CHONG WH (2019). Fournier Gangrene Associated With Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors: A Review of Spontaneous Postmarketing Cases. *Ann Intern Med*, **170(11)**: 764-769. doi:10.7326/M19-0085

BHARTIA M, TAHRANI AA, BARNETT AH (2011). SGLT-2 inhibitors in development for type 2 diabetes treatment. *Rev Diabet Stud*, **8(3)**: 348-354. doi:10.1900/RDS.2011.8.348

BIDASEE KR, ZHENG H, SHAO CH, PARBHU SK, ROZANSKI GJ, PATEL KP (2008). Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of beta-adrenoceptors. *J Appl Physiol (1985)*, **105(3)**: 907-914. doi:10.1152/jappphysiol.00103.2008

- BILLGER M, KIRK J, CHANG J, BEDARD A, ATTALLA B, HAILE S, SODERBERG M (2019). A study in a rat initiation-promotion bladder tumour model demonstrated no promoter/progressor potential of dapagliflozin. *Regul Toxicol Pharmacol*, **103**: 166-173. doi:10.1016/j.yrtph.2019.01.031
- BLAIR M (2016). Diabetes Mellitus Review. *Urol Nurs*, **36(1)**: 27-36.
- BOND RA, CLARKE DE (1988). Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the alpha- and beta-subtypes. *Br J Pharmacol*, **95(3)**: 723-734. doi:10.1111/j.1476-5381.1988.tb11698.x
- BONORA BM, AVOGARO A, FADINI GP (2018). Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors and diabetic ketoacidosis: An updated review of the literature. *Diabetes Obes Metab*, **20(1)**: 25-33. doi:10.1111/dom.13012
- BRISTOW MR, GINSBURG R, MINOBE W, CUBICCIOTTI RS, SAGEMAN WS, LURIE K, BILLINGHAM ME, HARRISON DC, STINSON EB (1982). Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*, **307(4)**: 205-211. doi:10.1056/NEJM198207223070401
- BRODDE OE (1991). Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev*, **43(2)**: 203-242.
- BRODDE OE (1993). Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther*, **60(3)**: 405-430.
- BRODDE OE, MICHEL MC (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*, **51(4)**: 651-690.
- BUGGER H, ABEL ED (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, **57(4)**: 660-671. doi:10.1007/s00125-014-3171-6
- BUSE JB, WEXLER DJ, TSAPAS A, ROSSING P, MINGRONE G, MATHIEU C, D'ALESSIO DA, DAVIES MJ (2020). 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, **43(2)**: 487-493. doi:10.2337/dci19-0066
- CANNAVO A, KOCH WJ (2017). Targeting beta3-Adrenergic Receptors in the Heart: Selective Agonism and beta-Blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*, **69(2)**: 71-78. doi:10.1097/FJC.0000000000000444
- CARRILLO-SEPULVEDA MA, MATSUMOTO T, NUNES KP, WEBB RC (2014). Therapeutic implications of peptide interactions with G-protein-coupled receptors in diabetic vasculopathy. *Acta Physiol (Oxf)*, **211(1)**: 20-35. doi:10.1111/apha.12281

- CHATTERJEE S, KHUNTI K, DAVIES MJ (2017). Type 2 diabetes. *Lancet*, **389(10085)**: 2239-2251. doi:10.1016/S0140-6736(17)30058-2
- CHEREZOV V, ROSENBAUM DM, HANSON MA, RASMUSSEN SG, THIAN FS, KOBILKA TS, CHOI HJ, KUHN P, WEIS WI, KOBILKA BK, STEVENS RC (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, **318(5854)**: 1258-1265. doi:10.1126/science.1150577
- CHIN KL, OFORI-ASENSO R, HOPPER I, VON LUEDER TG, REID CM, ZOUNGAS S, WANG BH, LIEW D (2019). Potential mechanisms underlying the cardiovascular benefits of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors: a systematic review of data from preclinical studies. *Cardiovasc Res*, **115(2)**: 266-276. doi:10.1093/cvr/cvy295
- CHO NH, SHAW JE, KARURANGA S, HUANG Y, DA ROCHA FERNANDES JD, OHLROGGE AW, MALANDA B (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*, **138**: 271-281. doi:10.1016/j.diabres.2018.02.023
- COMAN OA, PAUNESCU H, GHITA I, COMAN L, BADARARU A, FULGA I (2009). Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. *Rom J Morphol Embryol*, **50(2)**: 169-179.
- CONTROL G, TURNBULL FM, ABRAIRA C, ANDERSON RJ, BYINGTON RP, CHALMERS JP, DUCKWORTH WC, EVANS GW, GERSTEIN HC, HOLMAN RR, MORITZ TE, NEAL BC, NINOMIYA T, PATEL AA, PAUL SK, TRAVERT F, WOODWARD M (2009). Intensive glucose control and macrovascular outcomes in type 2 diabetes. *Diabetologia*, **52(11)**: 2288-2298. doi:10.1007/s00125-009-1470-0
- DAVIES MJ, D'ALESSIO DA, FRADKIN J, KERNAN WN, MATHIEU C, MINGRONE G, ROSSING P, TSAPAS A, WEXLER DJ, BUSE JB (2018a). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia*, **61(12)**: 2461-2498. doi:10.1007/s00125-018-4729-5
- DAVIES MJ, D'ALESSIO DA, FRADKIN J, KERNAN WN, MATHIEU C, MINGRONE G, ROSSING P, TSAPAS A, WEXLER DJ, BUSE JB (2018b). Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, **41(12)**: 2669-2701. doi:10.2337/dci18-0033
- DEFRONZO RA, DAVIDSON JA, DEL PRATO S (2012). The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia. *Diabetes Obes Metab*, **14(1)**: 5-14. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01511.x

- DEI CAS A, KHAN SS, BUTLER J, MENTZ RJ, BONOW RO, AVOGARO A, TSCHOEPE D, DOEHNER W, GREENE SJ, SENNI M, GHEORGHIADE M, FONAROW GC (2015). Impact of diabetes on epidemiology, treatment, and outcomes of patients with heart failure. *JACC Heart Fail*, **3(2)**: 136-145. doi:10.1016/j.jchf.2014.08.004
- DERKACH KV, BONDAREVA VM, MOYSEYUK IV, SHPAKOV AO (2014). [The influence of two-month treatment with bromocryptine on activity of the adenylyl cyclase signaling system in the myocardium and testes of rats with type 2 diabetes mellitus]. *Tsitologiya*, **56(12)**: 907-918.
- DESOUZA CV, GUPTA N, PATEL A (2015). Cardiometabolic Effects of a New Class of Antidiabetic Agents. *Clin Ther*, **37(6)**: 1178-1194. doi:10.1016/j.clinthera.2015.02.016
- DHALLA NS, TAKEDA N, RODRIGUEZ-LEYVA D, ELIMBAN V (2014). Mechanisms of subcellular remodeling in heart failure due to diabetes. *Heart Fail Rev*, **19(1)**: 87-99. doi:10.1007/s10741-013-9385-8
- DINCER UD, BIDASEE KR, GUNER S, TAY A, OZCELIKAY AT, ALTAN VM (2001). The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes*, **50(2)**: 455-461.
- DINCER UD, ONAY A, ARI N, OZCELIKAY AT, ALTAN VM (1998). The effects of diabetes on beta-adrenoceptor mediated responsiveness of human and rat atria. *Diabetes Res Clin Pract*, **40(2)**: 113-122.
- DING M, LEI J, HAN H, LI W, QU Y, FU E, FU F, WANG X (2015). SIRT1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via activating eNOS in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*, **14**: 143. doi:10.1186/s12933-015-0299-8
- DUCKWORTH WC (2001). Hyperglycemia and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*, **3(5)**: 383-391.
- DZIMIRI N (1999). Regulation of beta-adrenoceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacol Rev*, **51(3)**: 465-501.
- EHRENKRANZ JR, LEWIS NG, KAHN CR, ROTH J (2005). Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev*, **21(1)**: 31-38. doi:10.1002/dmrr.532
- EINARSON TR, ACS A, LUDWIG C, PANTON UH (2018). Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc Diabetol*, **17(1)**: 83. doi:10.1186/s12933-018-0728-6

- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2019). Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/minutes/minutes-prac-meeting-26-29-november-2018_en.pdf. Erişim tarihi: 16.06.2020.
- FANG ZY, PRINS JB, MARWICK TH (2004). Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev*, **25(4)**: 543-567. doi:10.1210/er.2003-0012
- FERRANNINI E, RAMOS SJ, SALSALI A, TANG W, LIST JF (2010). Dapagliflozin monotherapy in type 2 diabetic patients with inadequate glycemic control by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Diabetes Care*, **33(10)**: 2217-2224. doi:10.2337/dc10-0612
- FIORETTO P, DEL PRATO S, BUSE JB, GOLDENBERG R, GIORGINO F, REYNER D, LANGKILDE AM, SJOSTROM CD, SARTIPY P, INVESTIGATORS DS (2018). Efficacy and safety of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes and moderate renal impairment (chronic kidney disease stage 3A): The DERIVE Study. *Diabetes Obes Metab*, **20(11)**: 2532-2540. doi:10.1111/dom.13413
- FONSECA VA, FERRANNINI E, WILDING JP, WILPSHAAR W, DHANJAL P, BALL G, KLASSEN S (2013). Active- and placebo-controlled dose-finding study to assess the efficacy, safety, and tolerability of multiple doses of ipragliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, **27(3)**: 268-273. doi:10.1016/j.jdiacomp.2012.11.005
- FOOTE C, PERKOVIC V, NEAL B (2012). Effects of SGLT2 inhibitors on cardiovascular outcomes. *Diab Vasc Dis Res*, **9(2)**: 117-123. doi:10.1177/1479164112441190
- FOY JM, LUCAS PD (1976). Effect of experimental diabetes, food deprivation and genetic obesity on the sensitivity of pithed rats to autonomic agents. *Br J Pharmacol*, **57(2)**: 229-234. doi:10.1111/j.1476-5381.1976.tb07472.x
- FREDERSDORF S, THUMANN C, ULUCAN C, GRIESE DP, LUCHNER A, RIEGGER GA, KROMER EP, WEIL J (2004). Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol*, **13(1)**: 11-19. doi:10.1016/S1054-8807(03)00109-1
- FURTADO RHM, BONACA MP, RAZ I, ZELNIKER TA, MOSENZON O, CAHN A, KUDER J, MURPHY SA, BHATT DL, LEITER LA, MCGUIRE DK, WILDING JPH, RUFF CT, NICOLAU JC, GAUSE-NILSSON IAM, FREDRIKSSON M, LANGKILDE AM, SABATINE MS, WIVIOTT SD (2019). Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Previous Myocardial Infarction. *Circulation*, **139(22)**: 2516-2527. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039996
- GAIKWAD AB, GUPTA J, TIKOO K (2010). Epigenetic changes and alteration of Fbn1 and Col3A1 gene expression under hyperglycaemic and hyperinsulinaemic conditions. *Biochem J*, **432(2)**: 333-341. doi:10.1042/BJ20100414

- GANDO S, HATTORI Y, AKAISHI Y, NISHIHARA J, KANNO M (1997). Impaired contractile response to beta adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in beta adrenoceptors-G protein-adenylate cyclase system and phospholamban phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther*, **282(1)**: 475-484.
- GAUTHIER C, LANGIN D, BALLIGAND JL (2000). Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*, **21(11)**: 426-431. doi:10.1016/s0165-6147(00)01562-5
- GAUTHIER C, LEBLAIS V, KOBZIK L, TROCHU JN, KHANDOUDI N, BRIL A, BALLIGAND JL, LE MAREC H (1998). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest*, **102(7)**: 1377-1384. doi:10.1172/JCI2191
- GAUTHIER C, TAVERNIER G, CHARPENTIER F, LANGIN D, LE MAREC H (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest*, **98(2)**: 556-562. doi:10.1172/JCI118823
- GEORGE MS, PITT GS (2006). The real estate of cardiac signaling: location, location, location. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103(20)**: 7535-7536. doi:10.1073/pnas.0602389103
- GERICH JE (2010). Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med*, **27(2)**: 136-142. doi:10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x
- GRAY SP, JANDELEIT-DAHM K (2014). The pathobiology of diabetic vascular complications--cardiovascular and kidney disease. *J Mol Med (Berl)*, **92(5)**: 441-452. doi:10.1007/s00109-014-1146-1
- HABIBI J, AROOR AR, SOWERS JR, JIA G, HAYDEN MR, GARRO M, BARRON B, MAYOUX E, RECTOR RS, WHALEY-CONNELL A, DEMARCO VG (2017). Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, **16(1)**: 9. doi:10.1186/s12933-016-0489-z
- HALEY JM, THACKERAY JT, KOLAJOVA M, THORN SL, DASILVA JN (2015). Insulin therapy normalizes reduced myocardial beta-adrenoceptors at both the onset and after sustained hyperglycemia in diabetic rats. *Life Sci*, **132**: 101-107. doi:10.1016/j.lfs.2015.03.024
- HALIMI S, VERGES B (2014). Adverse effects and safety of SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Metab*, **40(6 Suppl 1)**: S28-34. doi:10.1016/S1262-3636(14)72693-X
- HAMMOUDI N, JEONG D, SINGH R, FARHAT A, KOMAJDA M, MAYOUX E, HAJJAR R, LEBECHE D (2017). Empagliflozin Improves Left Ventricular

Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther*, **31(3)**: 233-246. doi:10.1007/s10557-017-6734-1

HAN JH, OH TJ, LEE G, MAENG HJ, LEE DH, KIM KM, CHOI SH, JANG HC, LEE HS, PARK KS, KIM YB, LIM S (2017). The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE (-/-) mice fed a western diet. *Diabetologia*, **60(2)**: 364-376. doi:10.1007/s00125-016-4158-2

HAN S, HAGAN DL, TAYLOR JR, XIN L, MENG W, BILLER SA, WETTERAU JR, WASHBURN WN, WHALEY JM (2008). Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats. *Diabetes*, **57(6)**: 1723-1729. doi:10.2337/db07-1472

HEINONEN SE, GENOVE G, BENGTSSON E, HUBSCHLE T, AKESSON L, HISS K, BENARDEAU A, YLA-HERTTUALA S, JONSSON-RYLANDER AC, GOMEZ MF (2015). Animal models of diabetic macrovascular complications: key players in the development of new therapeutic approaches. *J Diabetes Res*, **2015**: 404085. doi:10.1155/2015/404085

HENRY RR, MURRAY AV, MARMOLEJO MH, HENNICKEN D, PTASZYNSKA A, LIST JF (2012). Dapagliflozin, metformin XR, or both: initial pharmacotherapy for type 2 diabetes, a randomised controlled trial. *Int J Clin Pract*, **66(5)**: 446-456. doi:10.1111/j.1742-1241.2012.02911.x

HEYLIGER CE, PIERCE GN, SINGAL PK, BEAMISH RE, DHALLA NS (1982). Cardiac alpha- and beta-adrenergic receptor alterations in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*, **77(6)**: 610-618. doi:10.1007/bf01908314

HUYNH K, BERNARDO BC, MCMULLEN JR, RITCHIE RH (2014). Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther*, **142(3)**: 375-415. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.01.003

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas (2000). **1**: Brussels, Belgium.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas (2006). **3**: Brussels, Belgium.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas (2017). **8**: Brussels, Belgium.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas (2019). **9**: Brussels, Belgium.

INZUCCHI SE, BERGENSTAL RM, BUSE JB, DIAMANT M, FERRANNINI E, NAUCK M, PETERS AL, TSAPAS A, WENDER R, MATTHEWS DR, AMERICAN

- DIABETES A, EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF D (2012). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, **35(6)**: 1364-1379. doi:10.2337/dc12-0413
- INZUCCHI SE, ZINMAN B, WANNER C, FERRARI R, FITCHETT D, HANTEL S, ESPADERO RM, WOERLE HJ, BROEDL UC, JOHANSEN OE (2015). SGLT-2 inhibitors and cardiovascular risk: proposed pathways and review of ongoing outcome trials. *Diab Vasc Dis Res*, **12(2)**: 90-100. doi:10.1177/1479164114559852
- JABBOUR S, SEUFERT J, SCHEEN A, BAILEY CJ, KARUP C, LANGKILDE AM (2018). Dapagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus: A pooled analysis of safety data from phase IIb/III clinical trials. *Diabetes Obes Metab*, **20(3)**: 620-628. doi:10.1111/dom.13124
- JAYAWARDENE D, WARD GM, O'NEAL DN, THEVERKALAM G, MACISAAC AI, MACISAAC RJ (2014). New treatments for type 2 diabetes: cardiovascular protection beyond glucose lowering? *Heart Lung Circ*, **23(11)**: 997-1008. doi:10.1016/j.hlc.2014.05.007
- JIANG C, CARILLION A, NA N, DE JONG A, FELDMAN S, LACORTE JM, BONNEFONT-ROUSSELOT D, RIOU B, AMOUR J (2015). Modification of the beta-Adrenoceptor Stimulation Pathway in Zucker Obese and Obese Diabetic Rat Myocardium. *Crit Care Med*, **43(7)**: e241-249. doi:10.1097/CCM.0000000000000999
- JORGENS V (2019). The roots of SGLT inhibition: Laurent-Guillaume de Koninck, Jean Servais Stas and Freiherr Josef von Mering. *Acta Diabetol*, **56(1)**: 29-31. doi:10.1007/s00592-018-1206-z
- JOUBERT M, JAGU B, MONTAIGNE D, MARECHAL X, TESSE A, AYER A, DOLLET L, LE MAY C, TOUMANIANTZ G, MANRIQUE A, CHARPENTIER F, STAELS B, MAGRE J, CARIOU B, PRIEUR X (2017). The Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Dapagliflozin Prevents Cardiomyopathy in a Diabetic Lipodystrophic Mouse Model. *Diabetes*, **66(4)**: 1030-1040. doi:10.2337/db16-0733
- KANAI Y, LEE WS, YOU G, BROWN D, HEDIGER MA (1994). The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest*, **93(1)**: 397-404. doi:10.1172/JCI116972
- KATO ET, SILVERMAN MG, MOSENZON O, ZELNIKER TA, CAHN A, FURTADO RHM, KUDER J, MURPHY SA, BHATT DL, LEITER LA, MCGUIRE DK, WILDING JPH, BONACA MP, RUFF CT, DESAI AS, GOTO S, JOHANSSON PA, GAUSE-NILSSON I, JOHANSON P, LANGKILDE AM, RAZ I, SABATINE MS, WIVIOTT SD (2019). Effect of Dapagliflozin on Heart Failure and Mortality in

Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation*, **139(22)**: 2528-2536.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040130

KAUMANN AJ (1997). Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci*, **18(3)**: 70-76. doi:10.1016/s0165-6147(96)01033-4

KAUMANN AJ, ENGELHARDT S, HEIN L, MOLENAAR P, LOHSE M (2001). Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double beta1/beta2-adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of beta1-adrenoceptors for putative beta4-adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **363(1)**: 87-93. doi:10.1007/s002100000336

KAUMANN AJ, MOLENAAR P (1997). Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **355(6)**: 667-681. doi:10.1007/pl00004999

KAYKI-MUTLU G, ARIOGLU-INAN E, OZAKCA I, OZCELIKAY AT, ALTAN VM (2014). beta3-Adrenoceptor-mediated responses in diabetic rat heart. *Gen Physiol Biophys*, **33(1)**: 99-109. doi:10.4149/gpb_2013065

KAYKI-MUTLU G, KARAOMERLIOGLU I, ARIOGLU-INAN E, ALTAN VM (2019). Beta-3 adrenoceptors: A potential therapeutic target for heart disease. *Eur J Pharmacol*, **858**: 172468. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172468

KAYKI-MUTLU G, KARAOMERLIOGLU I, ARIOGLU-INAN E (2019). The effect of nitric oxide synthase on beta 3 adrenoceptor mediated relaxation in stz diabetic rat heart. *J Fac Pharm Ankara*, **43(1)**: 64-71.

KATRIN A, POORNIMA B, RICHARD AB, DAVID BB, SUSANNA C, DOMINIC D, VAN AD, DOUGLAS CE, SARAH G, EUGÉNIE G, ROBERT MG, TERRY HJ, PAUL H, REBECCA H, SHAHRIAR K, GAYANE M, MARTIN CM, KENNETH PM, SERGIO P, DIANNE P, RORY S, ROGER S ve PETER Z, (2019). **Adrenoceptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database.** *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, **4**. doi: 10.2218/gtopdb/F4/2019.4

KLABUNDE RE (2019). Erişim adresi:
<https://www.cvpharmacology.com/cardiostimulatory/beta-agonist>. Erişim tarihi:
16.06.2020.

KOSS KL, KRANIAS EG (1996). Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res*, **79(6)**: 1059-1063. doi:10.1161/01.res.79.6.1059

KRANIAS EG, HAJJAR RJ (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res*, **110(12)**: 1646-1660. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259754

- LAHNWONG S, CHATTIPAKORN SC, CHATTIPAKORN N (2018). Potential mechanisms responsible for cardioprotective effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors. *Cardiovasc Diabetol*, **17(1)**: 101. doi:10.1186/s12933-018-0745-5
- LAMERIS TW, DE ZEEUW S, ALBERTS G, BOOMSMA F, DUNCKER DJ, VERDOUW PD, VELD AJ, VAN DEN MEIRACKER AH (2000). Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation*, **101(22)**: 2645-2650.
- LANDS AM, ARNOLD A, MCAULIFF JP, LUDUENA FP, BROWN TG (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, **214**: 597-598.
- LATIFPOUR J, MCNEILL JH (1984). Cardiac autonomic receptors: effect of long-term experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*, **230(1)**: 242-249.
- LEE TM, CHANG NC, LIN SZ (2017). Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic Biol Med*, **104**: 298-310. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.035
- LEVITT KATZ LE, MAGGE SN, HERNANDEZ ML, MURPHY KM, MCKNIGHT HM, LIPMAN T (2011). Glycemic control in youth with type 2 diabetes declines as early as two years after diagnosis. *J Pediatr*, **158(1)**: 106-111. doi:10.1016/j.jpeds.2010.07.011
- LIN B, KOIBUCHI N, HASEGAWA Y, SUETA D, TOYAMA K, UEKAWA K, MA M, NAKAGAWA T, KUSAKA H, KIM-MITSUYAMA S (2014). Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*, **13**: 148. doi:10.1186/s12933-014-0148-1
- LIN HW, TSENG CH (2014). A Review on the Relationship between SGLT2 Inhibitors and Cancer. *Int J Endocrinol*, **2014**: 719578. doi:10.1155/2014/719578
- LITWIN SE, RAYA TE, ANDERSON PG, DAUGHERTY S, GOLDMAN S (1990). Abnormal cardiac function in the streptozotocin-diabetic rat. Changes in active and passive properties of the left ventricle. *J Clin Invest*, **86(2)**: 481-488. doi:10.1172/JCI114734
- LIU J, LIU Y, CHEN L, WANG Y, LI J (2013). Glucagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide Protects against Diabetic Cardiomyopathy by the Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *J Diabetes Res*, **2013**: 630537. doi:10.1155/2013/630537

- LJUNGGREN O, BOLINDER J, JOHANSSON L, WILDING J, LANGKILDE AM, SJOSTROM CD, SUGG J, PARIKH S (2012). Dapagliflozin has no effect on markers of bone formation and resorption or bone mineral density in patients with inadequately controlled type 2 diabetes mellitus on metformin. *Diabetes Obes Metab*, **14(11)**: 990-999. doi:10.1111/j.1463-1326.2012.01630.x
- MATSUDA N, HATTORI Y, GANDO S, AKAISHI Y, KEMMOTSU O, KANNO M (1999). Diabetes-induced down-regulation of beta1-adrenoceptor mRNA expression in rat heart. *Biochem Pharmacol*, **58(5)**: 881-885. doi:10.1016/s0006-2952(99)00164-1
- MATYAS C, NEMETH BT, OLAH A, TOROK M, RUPPERT M, KELLERMAYER D, BARTA BA, SZABO G, KOKENY G, HORVATH EM, BODI B, PAPP Z, MERKELY B, RADOVITS T (2017). Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in rats with type 2 diabetes. *Eur J Heart Fail*, **19(3)**: 326-336. doi:10.1002/ejhf.711
- MCGURNAGHAN SJ, BRIERLEY L, CAPARROTTA TM, MCKEIGUE PM, BLACKBOURN LAK, WILD SH, LEESE GP, MCCRIMMON RJ, MCKNIGHT JA, PEARSON ER, PETRIE JR, SATTAR N, COLHOUN HM, SCOTTISH DIABETES RESEARCH NETWORK EPIDEMIOLOGY G (2019). The effect of dapagliflozin on glycaemic control and other cardiovascular disease risk factors in type 2 diabetes mellitus: a real-world observational study. *Diabetologia*, **62(4)**: 621-632. doi:10.1007/s00125-018-4806-9
- MCMURRAY JJV, DEMETS DL, INZUCCHI SE, KOBER L, KOSIBOROD MN, LANGKILDE AM, MARTINEZ FA, BENGTSSON O, PONIKOWSKI P, SABATINE MS, SJOSTRAND M, SOLOMON SD, COMMITTEES D-H, INVESTIGATORS (2019). A trial to evaluate the effect of the sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor dapagliflozin on morbidity and mortality in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction (DAPA-HF). *Eur J Heart Fail*, **21(5)**: 665-675. doi:10.1002/ejhf.1432
- MCMURRAY JJV, SOLOMON SD, INZUCCHI SE, KOBER L, KOSIBOROD MN, MARTINEZ FA, PONIKOWSKI P, SABATINE MS, ANAND IS, BELOHLAVEK J, BOHM M, CHIANG CE, CHOPRA VK, DE BOER RA, DESAI AS, DIEZ M, DROZDZ J, DUKAT A, GE J, HOWLETT JG, KATOVA T, KITAKAZE M, LJUNGMAN CEA, MERKELY B, NICOLAU JC, O'MEARA E, PETRIE MC, VINH PN, SCHOU M, TERESHCHENKO S, VERMA S, HELD C, DEMETS DL, DOCHERTY KF, JHUND PS, BENGTSSON O, SJOSTRAND M, LANGKILDE AM, COMMITTEES D-HT, INVESTIGATORS (2019). Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med*, **381(21)**: 1995-2008. doi:10.1056/NEJMoa1911303
- MENG W, ELLSWORTH BA, NIRSCHE AA, MCCANN PJ, PATEL M, GIROTRA RN, WU G, SHER PM, MORRISON EP, BILLER SA, ZAHLER R, DESHPANDE PP, PULLOCKARAN A, HAGAN DL, MORGAN N, TAYLOR JR, OBERMEIER MT, HUMPHREYS WG, KHANNA A, DISCENZA L, ROBERTSON JG, WANG

- A, HAN S, WETTERAU JR, JANOVITZ EB, FLINT OP, WHALEY JM, WASHBURN WN (2008). Discovery of dapagliflozin: a potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem*, **51(5)**: 1145-1149. doi:10.1021/jm701272q
- MINZE MG, WILL KJ, TERRELL BT, BLACK RL, IRONS BK (2018). Benefits of SGLT2 Inhibitors Beyond Glycemic Control - A Focus on Metabolic, Cardiovascular and Renal Outcomes. *Curr Diabetes Rev*, **14(6)**: 509-517. doi:10.2174/1573399813666170816142351
- MONIOTTE S, KOBZIK L, FERON O, TROCHU JN, GAUTHIER C, BALLIGAND JL (2001). Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*, **103(12)**: 1649-1655. doi:10.1161/01.cir.103.12.1649
- MOTULSKY H (2020). GraphPad Software. **Prism 8.3.1**, San Diego, USA.
- MOURA J, BORSHEIM E, CARVALHO E (2014). The Role of MicroRNAs in Diabetic Complications-Special Emphasis on Wound Healing. *Genes (Basel)*, **5(4)**: 926-956. doi:10.3390/genes5040926
- NAHMIA S, BLIN N, ELALOUF JM, MATTEI MG, STROSBERG AD, EMORINE LJ (1991). Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J*, **10(12)**: 3721-3727.
- NDEFO UA, ANIDIOBI NO, BASHEER E, EATON AT (2015). Empagliflozin (Jardiance): A Novel SGLT2 Inhibitor for the Treatment of Type-2 Diabetes. *P T*, **40(6)**: 364-368.
- NEAL B, PERKOVIC V, MAHAFFEY KW, DE ZEEUW D, FULCHER G, ERONDU N, SHAW W, LAW G, DESAI M, MATTHEWS DR, GROUP CPC (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, **377(7)**: 644-657. doi:10.1056/NEJMoa1611925
- OELZE M, KROLLER-SCHON S, WELSCHOF P, JANSEN T, HAUSDING M, MIKHED Y, STAMM P, MADER M, ZINSSIUS E, AGDAULETOVA S, GOTTSCHLICH A, STEVEN S, SCHULZ E, BOTTARI SP, MAYOUX E, MUNZEL T, DAIBER A (2014). The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PLoS One*, **9(11)**: e112394. doi:10.1371/journal.pone.0112394
- OGURTSOVA K, DA ROCHA FERNANDES JD, HUANG Y, LINNENKAMP U, GUARIGUATA L, CHO NH, CAVAN D, SHAW JE, MAKAROFF LE (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract*, **128**: 40-50. doi:10.1016/j.diabres.2017.03.024

- PERREAULT L (2017). EMPA-REG OUTCOME: The Endocrinologist's Point of View. *Am J Med*, **130(6S)**: S51-S56. doi:10.1016/j.amjmed.2017.04.005
- PHAM SV, CHILTON RJ (2017). EMPA-REG OUTCOME: The Cardiologist's Point of View. *Am J Cardiol*, **120(1S)**: S53-S58. doi:10.1016/j.amjcard.2017.05.011
- PHROMMINTIKUL A, WONGCHAROEN W, KUMFU S, JAIWONGKAM T, GUNAPARN S, CHATTIPAKORN S, CHATTIPAKORN N (2019). Effects of dapagliflozin vs vildagliptin on cardiometabolic parameters in diabetic patients with coronary artery disease: a randomised study. *Br J Clin Pharmacol*. doi:10.1111/bcp.13903
- POOLE RM, DUNGO RT (2014). Ipragliflozin: first global approval. *Drugs*, **74(5)**: 611-617. doi:10.1007/s40265-014-0204-x
- PTASZYNSKA A, COHEN SM, MESSING EM, REILLY TP, JOHNSON E, JOHNSON K (2015). Assessing Bladder Cancer Risk in Type 2 Diabetes Clinical Trials: the Dapagliflozin Drug Development Program as a 'Case Study'. *Diabetes Ther*, **6(3)**: 357-375. doi:10.1007/s13300-015-0128-9
- PTASZYNSKA A, HARDY E, JOHNSON E, PARIKH S, LIST J (2013). Effects of dapagliflozin on cardiovascular risk factors. *Postgrad Med*, **125(3)**: 181-189. doi:10.3810/pgm.2013.05.2667
- QIU R, BALIS D, XIE J, DAVIES MJ, DESAI M, MEININGER G (2017). Longer-term safety and tolerability of canagliflozin in patients with type 2 diabetes: a pooled analysis. *Curr Med Res Opin*, **33(3)**: 553-562. doi:10.1080/03007995.2016.1271780
- RADHOLM K, FIGTREE G, PERKOVIC V, SOLOMON SD, MAHAFFEY KW, DE ZEEUW D, FULCHER G, BARRETT TD, SHAW W, DESAI M, MATTHEWS DR, NEAL B (2018). Canagliflozin and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation*, **138(5)**: 458-468. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034222
- RADOVITS T, KORKMAZ S, LOGANATHAN S, BARNUCZ E, BOMICKE T, ARIF R, KARCK M, SZABO G (2009). Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **297(1)**: H125-133. doi:10.1152/ajpheart.00165.2009
- RASCHI E, PARISOTTO M, FORCESI E, LA PLACA M, MARCHESINI G, DE PONTI F, POLUZZI E (2017). Adverse events with sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: A global analysis of international spontaneous reporting systems. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **27(12)**: 1098-1107. doi:10.1016/j.numecd.2017.10.008
- RASMUSSEN SG, CHOI HJ, ROSENBAUM DM, KOBILKA TS, THIAN FS, EDWARDS PC, BURGHAMMER M, RATNALA VR, SANISHVILI R, FISCHETTI RF, SCHERTLER GF, WEIS WI, KOBILKA BK (2007). Crystal structure of the human

beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **450(7168)**: 383-387. doi:10.1038/nature06325

RIEG T, VALLON V (2018). Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors. *Diabetologia*, **61(10)**: 2079-2086. doi:10.1007/s00125-018-4654-7

RIZZO M, AL-BUSAIDI N, RIZVI AA (2015). Dapagliflozin therapy in type-2 diabetes: current knowledge and future perspectives. *Expert Opin Pharmacother*, **16(3)**: 281-284. doi:10.1517/14656566.2015.981528

ROCKMAN HA, CHOI DJ, AKHTER SA, JABER M, GIROS B, LEFKOWITZ RJ, CARON MG, KOCH WJ (1998). Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *J Biol Chem*, **273(29)**: 18180-18184. doi:10.1074/jbc.273.29.18180

RODEFELD MD, BEAU SL, SCHUESSLER RB, BOINEAU JP, SAFFITZ JE (1996). Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **7(11)**: 1039-1049. doi:10.1111/j.1540-8167.1996.tb00479.x

ROSEN P, HERBERG L, REINAUER H (1986). Different types of postinsulin receptor defects contribute to insulin resistance in hearts of obese Zucker rats. *Endocrinology*, **119(3)**: 1285-1291. doi:10.1210/endo-119-3-1285

ROSSETTI L, SMITH D, SHULMAN GI, PAPACHRISTOU D, DEFRONZO RA (1987). Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest*, **79(5)**: 1510-1515. doi:10.1172/JCI112981

SATMAN I, OMER B, TUTUNCU Y, KALACA S, GEDIK S, DINCCAG N, KARSIDAG K, GENC S, TELCI A, CANBAZ B, TURKER F, YILMAZ T, CAKIR B, TUOMILEHTO J, GROUP T-IS (2013). Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*, **28(2)**: 169-180. doi:10.1007/s10654-013-9771-5

SATMAN I, YILMAZ T, SENGUL A, SALMAN S, SALMAN F, UYGUR S, BASTAR I, TUTUNCU Y, SARGIN M, DINCCAG N, KARSIDAG K, KALACA S, OZCAN C, KING H (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*, **25(9)**: 1551-1556.

SAVARESE JJ, BERKOWITZ BA (1979). beta-Adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. *Life Sci*, **25(24-25)**: 2075-2078. doi:10.1016/0024-3205(79)90200-5

SCHALKWIJK CG, STEHOUWER CD (2005). Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, **109(2)**: 143-159. doi:10.1042/CS20050025

- SELLERS DJ, CHESS-WILLIAMS R (2001). The effect of streptozotocin-induced diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes in the rat. *J Auton Pharmacol*, **21(1)**: 15-21.
- SEMENIUK LM, KRYSKI AJ, SEVERSON DL (2002). Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283(3)**: H976-982. doi:10.1152/ajpheart.00088.2002
- SHAH AD, LANGENBERG C, RAPSOMANIKI E, DENAXAS S, PUJADES-RODRIGUEZ M, GALE CP, DEANFIELD J, SMEETH L, TIMMIS A, HEMINGWAY H (2015). Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol*, **3(2)**: 105-113. doi:10.1016/S2213-8587(14)70219-0
- SHESTAKOVA MV, WILDING JPH, WILPSHAAR W, TRETTER R, ORLOVA VL, VERBOVOY AF (2018). A phase 3 randomized placebo-controlled trial to assess the efficacy and safety of ipragliflozin as an add-on therapy to metformin in Russian patients with inadequately controlled type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, **146**: 240-250. doi:10.1016/j.diabres.2018.10.018
- SHI X, VERMA S, YUN J, BRAND-ARZAMENDI K, SINGH KK, LIU X, GARG A, QUAN A, WEN XY (2017). Effect of empagliflozin on cardiac biomarkers in a zebrafish model of heart failure: clues to the EMPA-REG OUTCOME trial? *Mol Cell Biochem*, **433(1-2)**: 97-102. doi:10.1007/s11010-017-3018-9
- SMITH GL, BUNKER CB, DINNEEN MD (1998). Fournier's gangrene. *Br J Urol*, **81(3)**: 347-355. doi:10.1046/j.1464-410x.1998.00532.x
- STEINBERG SF (1999). The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res*, **85(11)**: 1101-1111.
- SUNDARESAN PR, SHARMA VK, GINGOLD SI, BANERJEE SP (1984). Decreased beta-adrenergic receptors in rat heart in streptozotocin-induced diabetes: role of thyroid hormones. *Endocrinology*, **114(4)**: 1358-1363. doi:10.1210/endo-114-4-1358
- TAN Y, ZHANG Z, ZHENG C, WINTERGERST KA, KELLER BB, CAI L (2020). Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol*. doi:10.1038/s41569-020-0339-2
- TAYLOR SI, BLAU JE, ROTHER KI (2015). Possible adverse effects of SGLT2 inhibitors on bone. *Lancet Diabetes Endocrinol*, **3(1)**: 8-10. doi:10.1016/S2213-8587(14)70227-X
- THACKERAY JT, PARSA-NEZHAD M, KENK M, THORN SL, KOLAJOVA M, BEANLANDS RS, DASILVA JN (2011). Reduced CGP12177 binding to cardiac beta-adrenoceptors in hyperglycemic high-fat-diet-fed, streptozotocin-induced

diabetic rats. *Nucl Med Biol*, **38(7)**: 1059-1066.
doi:10.1016/j.nucmedbio.2011.04.002

TÜRKİYE İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ KURUMU (2016). SGLT2 inhibitörleri ile ilişkili diyabetik ketoasidoz riski konulu doktor mektubu. Erişim adresi: <https://www.titck.gov.tr/dinamikmodul/42?page=3>. Erişim tarihi: 16.06.2020.

TÜRKİYE İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ KURUMU (2019). SGLT2 inhibitörleri ile ilişkili fournier gangreni riski konulu doktor mektubu. Erişim adresi: <https://www.titck.gov.tr/dinamikmodul/42?page=1>. Erişim tarihi: 16.06.2020.

TSANG S, WONG SS, WU S, KRAVTSOV GM, WONG TM (2009). Testosterone-augmented contractile responses to alpha1- and beta1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *Am J Physiol Cell Physiol*, **296(4)**: C766-782. doi:10.1152/ajpcell.00193.2008

TÜRKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2018 (2018), **8**: Türkiye Diyabet Vakfı.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2018). Erişim adresi: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-warns-about-rare-occurrences-serious-infection-genital-area-sgl2-inhibitors-diabetes>. Erişim tarihi: 16.06.2020.

UTHMAN L, BAARTSCHEER A, BLEIJLEVENS B, SCHUMACHER CA, FIOLET JWT, KOEMAN A, JANCEV M, HOLLMANN MW, WEBER NC, CORONEL R, ZUURBIER CJ (2018). Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na(+)/H(+) exchanger, lowering of cytosolic Na(+) and vasodilation. *Diabetologia*, **61(3)**: 722-726. doi:10.1007/s00125-017-4509-7

UYAR-BOZTAS C, ARIOGLU-İNAN E, MUDERRISOGLU, AE, KAYKI-MUTLU G, ERDOGAN BR, YESILYURT ZE, KARAOMERLIOGLU I, ALTAN VM (2017). The effect of sitagliptin on beta-adrenoceptor-mediated cardiac responses in streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes Stoffwech H*, **26**:15.

VERMA S, MAZER CD, YAN AT, MASON T, GARG V, TEOH H, ZUO F, QUAN A, FARKOUH ME, FITCHETT DH, GOODMAN SG, GOLDENBERG RM, AL-OMRAN M, GILBERT RE, BHATT DL, LEITER LA, JUNI P, ZINMAN B, CONNELLY KA (2019). Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease: The EMPA-HEART CardioLink-6 Randomized Clinical Trial. *Circulation*, **140(21)**: 1693-1702. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042375

VIVIAN EM (2014). Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: a growing class of antidiabetic agents. *Drugs Context*, **3**: 212264. doi:10.7573/dic.212264

WANNER C (2017). EMPA-REG OUTCOME: The Nephrologist's Point of View. *Am J Med*, **130(6S)**: S63-S72. doi:10.1016/j.amjmed.2017.04.007

- WARNE T, SERRANO-VEGA MJ, BAKER JG, MOUKHAMETZIANOV R, EDWARDS PC, HENDERSON R, LESLIE AG, TATE CG, SCHERTLER GF (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **454(7203)**: 486-491. doi:10.1038/nature07101
- WASHBURN WN (2009). Development of the renal glucose reabsorption inhibitors: a new mechanism for the pharmacotherapy of diabetes mellitus type 2. *J Med Chem*, **52(7)**: 1785-1794. doi:10.1021/jm8013019
- WERNER RA, EISSLER C, HAYAKAWA N, ARIAS-LOZA P, WAKABAYASHI H, JAVADI MS, CHEN X, SHINAJI T, LAPA C, PELZER T, HIGUCHI T (2018). Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy using ECG-gated (18)F-FDG PET. *Sci Rep*, **8(1)**: 17631. doi:10.1038/s41598-018-35986-0
- WHITING DR, GUARIGUATA L, WEIL C, SHAW J (2011). IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*, **94(3)**: 311-321. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.029
- WILD S, ROGLIC G, GREEN A, SICREE R, KING H (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, **27(5)**: 1047-1053.
- WILDING J, BAILEY C, RIGNEY U, BLAK B, KOK M, EMMAS C (2017). Dapagliflozin therapy for type 2 diabetes in primary care: Changes in HbA1c, weight and blood pressure over 2 years follow-up. *Prim Care Diabetes*, **11(5)**: 437-444. doi:10.1016/j.pcd.2017.04.004
- WILDING JP (2014). The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. *Metabolism*, **63(10)**: 1228-1237. doi:10.1016/j.metabol.2014.06.018
- WIVIOTT SD, RAZ I, BONACA MP, MOSENZON O, KATO ET, CAHN A, SILVERMAN MG, ZELNIKER TA, KUDER JF, MURPHY SA, BHATT DL, LEITER LA, MCGUIRE DK, WILDING JPH, RUFF CT, GAUSE-NILSSON IAM, FREDRIKSSON M, JOHANSSON PA, LANGKILDE AM, SABATINE MS, INVESTIGATORS D-T (2019). Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, **380(4)**: 347-357. doi:10.1056/NEJMoa1812389
- WOLD LE, RELING DP, COLLIGAN PB, SCOTT GI, HINTZ KK, REN BH, EPSTEIN PN, REN J (2001). Characterization of contractile function in diabetic hypertensive cardiomyopathy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **33(9)**: 1719-1726. doi:10.1006/jmcc.2001.1431
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2016). Global Report on Diabetes. Erişim adresi: <https://www.who.int/diabetes/global-report/en/> Erişim tarihi: 24.06.2020

- WU L, WANG K, WANG W, WEN Z, WANG P, LIU L, WANG DW (2018). Glucagon-like peptide-1 ameliorates cardiac lipotoxicity in diabetic cardiomyopathy via the PPARalpha pathway. *Aging Cell*, **17(4)**: e12763. doi:10.1111/ace1.12763
- XIE N, ZHANG W, LI J, LIANG H, ZHOU H, DUAN W, XU X, YU S, ZHANG H, YI D (2011). alpha-Linolenic acid intake attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects in diabetic but not normal rats. *Arch Med Res*, **42(3)**: 171-181. doi:10.1016/j.arcmed.2011.04.008
- YE Y, BAJAJ M, YANG HC, PEREZ-POLO JR, BIRNBAUM Y (2017). SGLT-2 Inhibition with Dapagliflozin Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Cardiomyopathy in Mice with Type 2 Diabetes. Further Augmentation of the Effects with Saxagliptin, a DPP4 Inhibitor. *Cardiovasc Drugs Ther*, **31(2)**: 119-132. doi:10.1007/s10557-017-6725-2
- YESILYURT ZE, KARAOMERLIOGLU I, ERDOGAN BR, OZTURK G, MICHEL MC, ARIOGLU-INAN E (2019). A pilot study on the cardiac effects of low-dose empagliflozin in STZ- induced diabetic rats. *Diabetes Stoffwech H*, **28**: 26-27.
- ZHOU Y, WU W (2017). The Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Empagliflozin, Protects against Diabetic Cardiomyopathy by Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Cell Physiol Biochem*, **41(6)**: 2503-2512. doi:10.1159/000475942
- ZINMAN B, WANNER C, LACHIN JM, FITCHETT D, BLUHMKI E, HANTEL S, MATTHEUS M, DEVINS T, JOHANSEN OE, WOERLE HJ, BROEDL UC, INZUCCHI SE, INVESTIGATORS E-RO (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, **373(22)**: 2117-2128. doi:10.1056/NEJMoa1504720
- ZOPPINI G, TARGHER G, NEGRI C, STOICO V, PERRONE F, MUGGEO M, BONORA E (2009). Elevated serum uric acid concentrations independently predict cardiovascular mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, **32(9)**: 1716-1720. doi:10.2337/dc09-0625

EKLER

Ek.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 11/03/2015
TOPLANTI NO : 2015-4
DOSYA NO : 2015-65
KARAR NO : 2015-4-82

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.V.Melih Altan'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Ecz.İrem Karaömerlioğlu, Doç.Dr.Ebru Arıoğlu İnan ve Uzm.Ecz.Gizem Kaykı Mutlu'nun katıldığı "Sodyum Kotransporter-2 İnhibitörü Tip 2 Diabetik Ratlarda Kardiyovasküler Komplikasyonlar Üzerindeki Etkileri" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 105
Geçerlilik Süresi : 01/06/2015-01/06/2017

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi		
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : İrem
Soyadı : Karaömerlioğlu
Doğum yeri ve tarihi : Colorado/ABD, 22 Mart 1990
Uyruğu : T.C. ve A.B.D.
Medeni durumu : Bekâr
İletişim adresi ve telefon : Maltepe Mah. Müjde Sk. Emek Apt. 6/6 06570
Çankaya/Ankara/Türkiye
05343184572

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

Doktora

Farmakoloji Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi
(Eylül 2012- Şimdi)

Lisans

Sosyoloji Bölümü, Açıköğretim Fakültesi, Anadolu Üniversitesi
(Eylül 2016- Şimdi)

Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi (2007-2012)
Bitirme tezi: Parkinson ve Alzheimer'da Apoptozis

Yabancı dili

İngilizce

III- Mesleki Deneyimi

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı,
Araştırma Görevlisi (Ocak 2014- Ocak 2019)

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Ekonomik Değerlendirmeler ve İlaç Tedarik Daire Başkanlığı, İlaç Tedarik Yönetimi Birimi, Eczacı (Ocak 2019-Şimdi)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

British Pharmacological Society (2018-Şimdi)

American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (2019-Şimdi)

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları: (ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap ya da kitap bölümü vb.)

Uluslararası Makaleler

1. Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE, Ozturk N, Muderrisoglu AE, Michel MC, Arioglu-Inan E (2019). Normalization of organ bath contraction data for tissue specimen size: does one approach fit all? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. doi:10.1007/s00210-019-01727-x
2. Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Michel MC, Arioglu-Inan E (2019). Urinary bladder weight and function in a rat model of mild hyperglycemia and its treatment with dapagliflozin. *Front. Pharmacol*. 10:911. doi: 10.3389/fphar.2019.00911
3. Kayki-Mutlu G, Karaomerlioglu I, Arioglu-Inan E, Altan VM (2019). Beta-3 adrenoceptors: A potential therapeutic target for heart disease. *Eur. J. Pharmacol*. 858:172468. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172468
4. Kayki-Mutlu G, Arioglu-Inan E, Karaomerlioglu I, Altan VM, Yersal N, Korkusuz P ve ark. (2018). Role of the beta3-adrenergic receptor subtype in catecholamine-induced myocardial remodeling. *Mol Cell Biochem*. 446(1-2):149-60.
5. Durak A, Olgar Y, Tuncay E, Karaomerlioglu I, Kayki-Mutlu G, Arioglu-Inan E, ve ark. (2017). Onset of decreased heart work is correlated with increased heart rate and shortened QT interval in high-carbohydrate fed overweight rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 95(11):1335-42.

Ulusal Makaleler

1. Kayki-Mutlu G, Karaomerlioglu I, Arioglu-Inan E (2019). The effect of nitric oxide synthase on beta 3 adrenoceptor mediated relaxation in stz diabetic rat heart. *J. Fac. Pharm. Ankara*. 43(1): 64-71.
2. Kayki-Mutlu G, Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Arioglu-Inan E, Nuray A (2019). Epigallocateşin gallat (EGCG)'ın normal ve yüksek glukoz ortamında izole sıçan kardiyomiyositleri üzerindeki direct etkileri. *J Fac. Pharm. Ankara*, 43(1); 72-78.

Sözel Bildiriler

1. Karaomerlioglu I, Erdogan BR, Kayki-Mutlu G, Yesilyurt ZE, Muderrisoglu AE, Ozturk N, Altan VM, Arioglu-Inan E (2019). The effects of dapagliflozin treatment on cardiac parameters in high fat fed and low dose STZ induced diabetic rat. *Br J Pharmacol*. 176:3015. doi: 10.1111/bph.14681. Pharmacology 2018, Londra, UK (18-20 Aralık 2018)
2. Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Michel MC, Arioglu-Inan E (2019). A pilot study of the effect of mild hyperglycemia on urinary bladder relaxation by β - adrenoceptor agonists. *Br J Pharmacol*. 176:3076-3077. doi: 10.1111/bph.14681. Pharmacology 2018, Londra, UK (18-20 Aralık 2018)
3. Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE, Ozturk N, Muderrisoglu AE, Arioglu-Inan E, Michel MC (2019). Impact of normalization approaches for in vitro organ bath experiments in different rat tissues. *Br J Pharmacol*. 176:3077-3078. doi: 10.1111/bph.14681. Pharmacology 2018, Londra, UK (18-20 Aralık 2018)
4. Kayki-Mutlu G, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Erdogan BR, Altan VM, Arioglu-Inan E (2017). Regulation of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump by β_3 -adrenergic receptors in aortas from noradrenaline-treated rats. *Pharmacology 2017*, Londra, UK (11-13 Aralık 2017)
5. Arioglu-Inan E, Kayki-Mutlu G, Erdogan BR, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE, Degirmenci S, Turan B, Altan VM (2017). The effect of leptin on cardiac function in streptozotocin diabetic rats. *Pharmacology 2017*, Londra, UK (11-13 Aralık 2017)
6. Kayki-Mutlu G, Arioglu-Inan E, Karaomerlioglu I, Altan VM (2016). The Effect of Beta 3-ARs on $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ in Cardiac Hypertrophy. 7th European Congress of Pharmacology, İstanbul, TR (26-30 Haziran 2016)
7. Arioglu-Inan E, Kayki-Mutlu G, Karaomerlioglu I, Altan VM (2014). Beta-3-Adrenoceptor Mediated Responses In Diabetic Rat Thoracic Aorta. 7th

Poster Bildirileri

1. Erdogan BR, Yesilyurt ZE Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Sevim, K., Arioglu-Inan E (2019). Does sacubitril/valsartan have an impact on cardiac function through beta-ARs in HFD + low dose STZ diabetes model? *Br J Pharmacol.* 177:2604-5. doi: 10.1111/bph.15035. Pharmacology 2019, Edinburgh, UK (15-17 Aralık 2019)
2. Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE Erdogan BR, Kayki-Mutlu G, Muderrisoglu AE, Altan VM, Arioglu-Inan E (2019). Changes in β -adrenoceptor mediated responses and protein expression in dapagliflozin treated HFD and low dose STZ diabetic rat heart. 5th CVOT Summit of the D&CVD EASD Study Group, Mnih, DE (24- 25 Ekim 2019)
3. Yesilyurt ZE, Karaomerlioglu I, Erdogan BR, Ozturk G, Michel MC, Arioglu-Inan E (2019). A pilot study on the cardiac effects of low-dose empagliflozin in STZ- induced diabetic rats. 5th CVOT Summit of the D&CVD EASD Study Group, Mnih, DE (24- 25 Ekim 2019)
4. Ozturk N, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Erdogan BR, Yesilyurt ZE Arioglu-Inan E (2018). The effects of dapagliflozin on vascular responses in high fat fed low dose streptozotocin induced diabetes model. Pharmacology 2018, Londra, UK (18-20 Aralık 2018)
5. Kayki-Mutlu G, Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE (2018). Effects of three different flavonoids on cardiac contractility under high glucose concentrations. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 12), Ankara, TR (26-29 Haziran 2018)
6. Muderrisoglu AE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Martin MC, Arioglu-Inan E (2018). The Normalization Of Contractile Response In Diabetic Rat Aorta. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 12), Ankara, TR (26-29 Haziran 2018)
7. Karaomerlioglu I, Kayki-Mutlu G, Ozturk N, Erdogan BR, Muderrisoglu AE, Yesilyurt ZE, Altan VM, Arioglu-Inan E (2017). The effect of dapagliflozin treatment on beta adrenoceptor-mediated responses in high fat fed diabetic rat heart. 3rd CVOT Summit of the D&CVD EASD Study Group, Mnih, DE (26- 27 Ekim 2017)
8. Uyar-Boztas C, Arioglu-Inan E, Muderrisoglu AE, Kayki-Mutlu G, Erdogan BR, Yesilyurt ZE, Karaomerlioglu I, Altan VM (2017). The effect of sitagliptin on beta-adrenoceptor-mediated cardiac responses in streptozotocin

induced diabetic rats. 3rd CVOT Summit of the D&CVD EASD Study Group, Mnnih, DE (26- 27 Ekim 2017)

9. Muderrisoglu AE, Erdogan BR, Yesilyurt ZE, Uyar-Boztas C, Karaomerlioglu I, Altan VM, Arioglu-Inan E (2017). The effects of sitagliptin treatment on beta 3 adrenergic receptor mediated relaxation responses in streptozotocine-induced diabetic rat aorta. 9th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease, Milan, İtalya (22-24 Haziran 2017)
10. Arioglu-Inan E, Durak A, Olgar Y, Tuncay E, Kayki-Mutlu G, Karaomerlioglu I, Altan VM, Turan B (2017). Altered heart function in high sucrose-fed overweight rats: In vivo and in vitro investigations. 9th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease, Milan, İ (22-24 Haziran 2017)
11. Arioglu-Inan E, Erdogan BR, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Kayki-Mutlu G, Onay-Besikci A, Altan VM (2016). The effect of leptin treatment on in vivo cardiac parameters of streptozotocin induced diabetic rats. 9th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease, Maffliers, F (30 Haziran- 2 Temmuz 2016)
12. Arioglu-Inan E, Ozakca I, Kayki-Mutlu G, Karaomerlioglu I, Altan VM (2015). The effect of thyroid hormone-insulin interaction on diabetic rat aorta. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, TR (Haziran 2015)
13. Arioglu-Inan E, Kayki-Mutlu G, Karaomerlioglu I, Altan VM (2014). "Beta-3-Adrenoceptor Mediated Responses In Diabetic Rat Thoracic Aorta", 7th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease, Milan, İ (6-8 Kasım 2014)
14. Arioglu-Inan E, Kayki-Mutlu G, Karaomerlioglu I, Altan VM (2013). Increased β 3-adrenoceptor-mediated negative inotropic effect in diabetic rat heart. 6th Diabetes and Cardiovascular Disease (D&CVD) EASD Study Group Annual Meeting, Prag, CZ (31 Ekim-2 Kasım 2013)

zet Bildiri

Erdogan BR, Yesilyurt ZE, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Arioglu-Inan E, Michel MC (2018). A comparison of normalization approaches for in vitro contraction experiments of urinary bladder. ICS 2018, Philadelphia, USA (28-31 Ağustos 2018)

VII- Bilimsel Etkinlikleri

PCR Temelli Genetik Analiz Yaklaşımları, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (10-11 Haziran 2013) (Kurs Prof. Dr. Hilal Özdağ tarafından verildi.)

Ion Channels and Calcium Signalling Workshop, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İzmir (15-16 Eylül 2014)

Summer School- Pharmacotherapy in the Hospital and Community Setting, Institut Teknologi Bandung, Bandung, RI (30 Temmuz 2017 – 13 Ağustos 2017)

Statistics Course, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (16-19 Ekim 2018) (Kurs Johannes Gutenberg Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Martin C. Michel tarafından verildi.)

“True data – how to produce high quality research results” Statistics Course, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, TR (10-13 Mart 2020) (Kurs Johannes Gutenberg Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Martin C. Michel tarafından verildi.)

Aldığı Burslar

5th CVOT Summit of the D&CVD EASD Study Group Travel Grant, Münih, DE (24- 25 Ekim 2019)

3rd CVOT Summit of the D&CVD EASD Study Group Travel Grant, Münih, DE (26- 27 Ekim 2017)

Hayat Boyu Öğrenme Programları/Erasmus Programı bursu, Cardiff Üniversitesi, UK (Eylül- Aralık 2013)

Yüksek Öğrenim Kredi ve Yurtlar Genel Müdürlüğü Doktora bursu (2013-2014)

Projeleri

1. 117S936 Nolu TÜBİTAK Projesi (Valsartan/Sakubitril Kombinasyonu LCZ696'nın Diabetik Kardiyak Disfonksiyon Üzerine Olası Etkilerinin Beta Adrenerjik Yanıtverirlik Üzerinden Değerlendirilmesi), Ankara Üniversitesi, Araştırmacı (Kasım 2017- Kasım 2018)
2. 16L0237006 Nolu BAP Projesi (SGLT2 inhibitörü dapagliflozinin tip 2 diabetik ratlarda kardiyovasküler komplikasyonlar üzerine etkisi), Ankara Üniversitesi, Araştırmacı (Haziran 2016- Haziran 2018)

Seminerler

Diabetik kardiyomiyopatide mikro-RNA'ların rolü. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, TR (Mayıs 2013)

Sıçanlardaki iletken ve dirençli damarlarda cAMP ya da NO/cGMP yolları ile gevşeme cevabı oluşturan, farklı β - adrenoreptör alttipleri. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, TR (2 Nisan 2013)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar

TS EN ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi,
TS EN ISO 9001:2015 Risk Tabanlı Proses Yönetimi Eğitimi,
TS EN ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Dokümantasyon Eğitimi,
TS EN ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi İç Tetkik Eğitimi, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, TR (11-15 Mart 2019)

Web Tasarımı Uygulamaları Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi (13 Aralık 2018)

Ankara Üniversitesinde Çevre Yönetimi ve Sıfır Atık Uygulamaları Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi (8 Kasım 2018)

Mobbing ve Cinsel Taciz Eğitimi Programı, Ankara Üniversitesi (16 Mart 2018)

İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi (22 Haziran 2015)

Araştırma Görevlileri için Eğiticilerin Eğitimi Sertifika Programı, Ankara Üniversitesi (24 Kasım- 18 Aralık 2014)

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi, Ankara, TR (14-25 Ocak 2013)

Temel Karanlık Oda Atölyesi, Ka Atölye, Ankara, TR (Kasım 2012)

Katıldığı eğitim seminerleri

Endnote Kullanım Semineri, Ankara Üniversitesi, Ankara, TR (2014)

Diğer üyelikleri

Ankara Eczacı Odası (2019-Şimdi)