

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STREPTOZOTOSİN DİYABETİK SIÇAN AORTASINDA  
BETA 3-ADRENOSEPTÖR ARACILI YANITLARA  
SİTAGLİPTİNİN OLASI ETKİLERİ**

**Ayhanım Elif MÜDERRİSOĞLU**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN**

**ANKARA**

**2017**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Streptozotosin Diyabetik Sıçan Aortasında Beta 3-Adrenoseptör Aracılı Yanıtlara Sitagliptinin Olası Etkileri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Ayhanım Elif MÜDERRİSOĞLU

13.07.2017

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalında

Ayhanım Elif MÜDERRİSOĞLU tarafından hazırlanan

“Streptozotosin Diyabetik Sıçan Aortasında Beta 3-Adrenoseptör Aracılı Yanıtlara  
Sitagliptinin Olası Etkileri” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak

OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04.08.2017

Prof. Dr. Nuray ARI

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mustafa ARK

Gazi Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN

Ankara Üniversitesi

Üye (Tez Danışmanı)

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

# İÇİNDEKİLER

|                         |      |
|-------------------------|------|
| Etik Beyan              | ii   |
| Kabul ve Onay           | iii  |
| İçindekiler             | iv   |
| Önsöz                   | vi   |
| Simgeler ve Kısaltmalar | viii |
| Şekiller                | xi   |
| Çizelgeler              | xiii |

## 1. GİRİŞ

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Diabetes Mellitus                                          | 1  |
| 1.1.1. Diabetes Mellitus'un Vasküler Komplikasyonları           | 6  |
| 1.1.2. Endotelyal Disfonksiyon                                  | 8  |
| 1.1.3. Nitrik Oksit Salıverilmesini Arttıran Faktörler          | 14 |
| 1.2. İnkretin Mimetikler                                        | 15 |
| 1.2.1. GLP-1 Analogları                                         | 16 |
| 1.2.2. Dipeptidil Peptidaz 4 (DPP4) İnhibitörleri               | 17 |
| 1.2.2.1. DPP4 İnhibitörlerinin Vasküler Sistem Üzerine Etkileri | 19 |
| 1.3. $\beta$ Adrenerjik Reseptörler                             | 20 |
| 1.3.1. $\beta_3$ Adrenerjik Reseptörler                         | 22 |
| 1.3.2. Kardiyak Sistemde $\beta_3$ Adrenoseptörlerin Rolü       | 23 |
| 1.3.3. Vasküler Sistemde $\beta_3$ Adrenoseptörlerin Rolü       | 24 |
| 1.4. Amaç                                                       | 24 |

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 2.1. Kullanılan Gereçler | 26 |
| 2.1.1. Malzemeler        | 26 |
| 2.1.2. Kimyasal maddeler | 28 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.3. Deney Hayvanları                                                    | 30 |
| 2.2. Kullanılan Yöntemler                                                  | 30 |
| 2.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması                                     | 30 |
| 2.2.2. Deneysel Diyabetin Oluşturulması                                    | 31 |
| 2.2.3. İzole Organ Banyosu Deneyleri                                       | 31 |
| 2.2.3.1. Torasik Aorta Halkalarının (Ringlerinin) Hazırlanması             | 31 |
| 2.2.3.2. Torasik Aorta Halkalarında Kasılma-Gevşeme Yanıtlarının Ölçülmesi | 32 |
| 2.2.4. Western Blot Deneyleri                                              | 33 |
| 2.2.5. Histopatoloji ve İmmünohistokimya Deneyleri                         | 34 |
| 2.2.6. İstatistiksel Analiz                                                | 35 |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                         |    |
| 3.1. Sıçanların Genel Özellikleri                                          | 36 |
| 3.2. İzole Organ Banyosu Deney Sonuçları                                   | 37 |
| 3.2.1. Fenilefrin Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri                             | 37 |
| 3.2.2. İzoprenalin Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri                            | 37 |
| 3.2.3. CL 316,243 Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri                             | 38 |
| 3.2.4. L-NAME Varlığında CL 316,243 Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri           | 39 |
| 3.3. $\beta_3$ -AR, eNOS ve Fosforile-eNOS Protein İfadeleri               | 40 |
| 3.4. Histopatolojik Bulgular                                               | 42 |
| 3.5. İmmünohistokimyasal Bulgular                                          | 47 |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                         | 53 |
| <b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                                | 60 |
| <b>ÖZET</b>                                                                | 62 |
| <b>SUMMARY</b>                                                             | 63 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                           | 64 |
| <b>EKLER</b>                                                               | 74 |
| Ek-1. Etik Kurul Belgesi                                                   | 74 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                            | 76 |

## ÖNSÖZ

Diyabete bağı olarak kardiyovasküler hastalık gelişme riskinin önemli ölçüde arttığı bilinmektedir. Özellikle endotel aracılı gevşeme yanıtlarının azalması diyabetik bireylerde endotel disfonksiyonu gelişmesini tetiklemektedir. Uzun süreli diyabete bağı olarak gelişen endotel disfonksiyonunun temel nedeni NO seviyelerindeki düşüşe bağı olarak damar gevşeme yanıtlarında görülen azalmadır. DPP4 inhibitörlerinin damar gevşeme yanıtlarını düzelterek vasküler sistem üzerinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Ne var ki, DPP4 inhibitörlerinin kullanımının damar endotelinde bulunan ve gevşeme yanıtlarına aracılık eden beta 3 adrenoseptörleri nasıl etkilediğine ilişkin çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle, planladığımız çalışma ile sitagliptinin diyabetik sıçan aortasındaki olası etkileri beta 3 adrenoseptörler üzerinden değerlendirilmiştir.

Çalışmalarım boyunca deneyimi ve bilgi birikimiyle bana yol gösteren, bu uzun ve zorlu süreçte beni her anlamda destekleyen, çalışma disipliniyle her zaman örnek aldığım danışmanım Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan'a,

Herhangi bir konuda yardıma ihtiyaç duyduğumda desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen anabilim dalımız öğretim üyeleri Prof. Dr. Nuray Arı, Prof. Dr. Gülgün Ozansoy, Prof. Dr. Tanju Özçelikay, Prof. Dr. Serap Gür, Prof. Dr. Arzu Onay Beşikci ve Yrd. Doç. Dr. Işıl Özakca'ya,

Kendisiyle tanışma fırsatı bulduğum için onur duyduğum, hem bilimsel zekası, hem genel kültür seviyesi, hem renkli kişiliği hem de hayata dair bakış açısıyla her yönden hayran olduğum sayın hocam Prof. Dr. Melih Altan'a,

Her türlü özveriye göstererek gece gündüz demeden benimle birlikte çalışan, sıkıntıya düştüğüm her anımda beni destekleyen, her durumda arkamı toparlayan, bana her zaman “iyi ki varsın” dedirten canım arkadaşım Ecz. Betül Erdoğan'a,

Destegini ve güler yüzünü benden hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Ecz. Gizem Kayk Mutlu'ya, deney sürecim boyunca bana her anlamda destek olan laboratuvar çalışma arkadaşlarım Ecz. İrem Karaömerlioğlu ve Ecz. Zeynep Elif Yeşilyurt'a, özellikle deney hayvanlarıyla ilgili her konuda destek gördüğüm, sevecenliğiyle çalışmalarıma neşe katan yol arkadaşım Ecz. Ceren Uyar Boztaş'a,

Hayvanların her türlü bakımında bana yardımcı olan İsmail Başer'e ve gereksinim duyduğum her türlü evrak içinde kendisinden hep güler yüzüyle yardım gördüğüm Fatma Cerepoğlu'na,

Başım sıkıştığında aramaktan çekinmediğim, beni her zaman anlayan ve bana hep destek olan canım arkadaşım Ecz. Sibel Gürpınar'a,

Beni bugünlere getiren, her kararımda bana destek olan, sevgi ve güvenleriyle her zaman yanımda olan canım annem Sdika Müderrisoğlu, babam Faruk Müderrisoğlu ve hayattaki en büyük şansım, canım kardeşim Cemre Müderrisoğlu'na,

Yüksek lisans tezim sırasında sağlamış oldukları destek nedeniyle Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne (BAP proje destek no: 17L0237002) ve TUBİTAK'a (SBAG-115S564)

TEşEKKüR EDERİM.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|               |                                                          |
|---------------|----------------------------------------------------------|
| $\alpha$      | Alfa                                                     |
| ACE           | Anjiyotensin dönüştürücü enzim                           |
| ADA           | American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Birliği) |
| ADAbp         | Adenozin deaminaz bağlayıcı protein                      |
| ADMA          | Asimetrik dimetilarjinin                                 |
| ADP           | Adenozin difosfat                                        |
| Akt           | Protein Kinaz B                                          |
| ATP           | Adenozin trifosfat                                       |
| $\beta_3$ -AR | Beta 3 Adrenoseptör                                      |
| BAPG          | Bozulmuş açlık plazma glukoza                            |
| BCA           | Bikinkoninik asit                                        |
| BGT           | Bozulmuş glukoz toleransı                                |
| BH4           | Tetrahidrobiopterin                                      |
| BNP           | B tipi natriüretik peptid                                |
| BSA           | Bovin serum albumin                                      |
| cGMP          | Siklik guanin monofosfat                                 |
| COMT          | Katekol-o-metil transferaz                               |
| DAG           | Diaçil gliserol                                          |
| DM            | Diabetes mellitus                                        |
| DPP4          | Dipeptidil peptidaz 4                                    |
| ECE           | Endotelin dönüştürücü enzim                              |

|        |                                                                     |
|--------|---------------------------------------------------------------------|
| ECL    | Enhanced chemiluminescence                                          |
| EDHF   | Endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü                          |
| eNOS   | Endotelial nitric oksit sentaz                                      |
| ERK    | Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz                              |
| ETZ    | Elektron transfer zinciri                                           |
| FAD    | Flavin adenin dinükleotit                                           |
| FDA    | Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)        |
| GIP    | Glukoza bağımlı insülinotropik peptit                               |
| GLP-1  | Glukagon benzeri peptid-1                                           |
| GLUT   | Glukoz transporter                                                  |
| GTP    | Guanozin trifosfat                                                  |
| HCl    | Hidroklorik asit                                                    |
| ICAM-1 | İnterselüler (hücrelerarası) adhezyon molekülü-1                    |
| IDF    | International Diabetes Federation (Uluslararası Diabet Federasyonu) |
| iNOS   | İndüklenebilir nitric oksit sentaz                                  |
| L-NAME | N(G)-Nitro-L-Arginin Metil Ester                                    |
| MAO    | Monoamin oksidaz                                                    |
| MAPK   | Mitojen aktive edici protein kinaz                                  |
| NADPH  | Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat                               |
| nNOS   | Nöronal nitric oksit sentaz                                         |
| NO     | Nitric oksit                                                        |
| OGTT   | Oral glukoz tolerans testi                                          |
| PAGE   | Poliakrilamid jel elektroforez                                      |

|          |                                                   |
|----------|---------------------------------------------------|
| PDE5     | Fosfodiesteraz 5                                  |
| PGI2     | Prostasiklin                                      |
| PKC      | Protein kinaz C                                   |
| PKG      | Protein kinaz G                                   |
| PI3K     | Fosfatidilinositol 3 kinaz                        |
| PVDF     | Poliviniliden difluorid                           |
| ROS      | Reaktif oksijen türleri                           |
| SDS      | Sodyum dodesil sülfat                             |
| SERCA    | Sarkoendoplazmik retikulum $\text{Ca}^{+2}$ ATPaz |
| sGC      | Çözünür guanilil siklaz                           |
| SREBP 1c | Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1c    |
| STZ      | Streptozotosin                                    |
| T1D      | Tip 1 Diabet                                      |
| T2D      | Tip 2 Diabet                                      |
| TBST     | Tris buffered saline % 0,1 Tween 20               |
| TEMED    | Tetrametiletildiamin                              |
| TGS      | Tris Glisin SDS tampon çözeltisi                  |
| VEGF     | Vasküler endoyelyal büyüme faktörü                |
| WHO      | World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)   |
| VCAM-1   | Vasküler hücre adhezyon molekülü-1                |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1.</b> Glukoz ile indüklenen insülin salıverilmesi şematik gösterimi (Marchetti ve ark., 2008)                                                                                                                                                                                            | 4  |
| <b>Şekil 1.2.</b> İntraselüler insülin sinyal kaskadının çeşitli dokulardaki şematik gösterimi (Forst ve ark., 2016)                                                                                                                                                                                 | 5  |
| <b>Şekil 1.3.</b> Endotel kaynaklı NO ile vasküler tonusun düzenlenmesi şematik gösterimi (Vanhoutte ve ark., 2016)                                                                                                                                                                                  | 12 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Sıçanların genel özellikleri A) Sıçanların 14 hafta sonunda ölüm anı kan şekeri değerleri B) Sıçanların 14 hafta sonunda ölüm anı beden ağırlıkları                                                                                                                                | 36 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Aortada fenilefrin yanıtları A) Fenilefrin konsantrasyon-yanıt eğrisi B) $10^{-5}$ M fenilefrin varlığında görülen maksimum etki                                                                                                                                                   | 37 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Aortada izoprenalin yanıtları A) İzoprenalin konsantrasyon-yanıt eğrisi B) $10^{-5}$ M izoprenalin varlığında görülen maksimum etki                                                                                                                                                | 38 |
| <b>Şekil 3.4.</b> Aortada CL 316,243 yanıtları A) CL 316,243 konsantrasyon-yanıt eğrisi B) $10^{-6}$ M CL 316,243 varlığında görülen maksimum etki                                                                                                                                                   | 39 |
| <b>Şekil 3.5.</b> L-NAME varlığında CL 316,243 konsantrasyon-yanıt eğrisi                                                                                                                                                                                                                            | 40 |
| <b>Şekil 3.6.</b> $\beta_3$ -AR protein ifade düzeyleri A) $\beta_3$ -AR protein band yoğunluğunun $\alpha$ -tubulin band yoğunluğuna oranı B) Repezantif band görüntüleri                                                                                                                           | 41 |
| <b>Şekil 3.7.</b> eNOS ve peNOS protein ifade düzeyleri A) peNOS protein band yoğunluğunun $\alpha$ -tubulin band yoğunluğuna oranı B) eNOS protein band yoğunluğunun $\alpha$ -tubulin band yoğunluğuna oranı C) peNOS band yoğunluğunun eNOS band yoğunluğuna oranı D) Repezantif band görüntüleri | 42 |
| <b>Şekil 3.8.</b> Kontrol grubuna ait sıçan aortası kesiti                                                                                                                                                                                                                                           | 43 |

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.9.</b> Diyabet grubunda yer alan sıçan aorta kesiti                                                   | 43 |
| <b>Şekil 3.10.</b> Sitagliptin tedavili grupta yer alan sıçan aortası                                            | 44 |
| <b>Şekil 3.11.</b> Aorta media katmanı kalınlığının karşılaştırması                                              | 44 |
| <b>Şekil 3.12.</b> Kontrol grubu sıçan aortası. Masson Trikrom boyaması                                          | 45 |
| <b>Şekil 3.13.</b> Diyabetik grupta yer alan sıçan aortası                                                       | 46 |
| <b>Şekil 3.14.</b> Sitagliptin tedavili diyabetik grupta yer alan sıçan aortası                                  | 46 |
| <b>Şekil 3.15.</b> Masson trikrom boyama ile elde edilen pozitif boyanma alanlarının karşılaştırması             | 47 |
| <b>Şekil 3.16.</b> Kontrol grubundaki sıçanlara ait aorta kesitinde eNOS boyanması                               | 48 |
| <b>Şekil 3.17.</b> Diyabetik gruptaki sıçanlara ait aorta kesitinde eNOS boyanması                               | 48 |
| <b>Şekil 3.18.</b> Sitagliptin tedavili diyabetik gruptaki sıçanlara ait aorta kesitinde eNOS boyanması          | 49 |
| <b>Şekil 3.19.</b> Gruplar arası eNOS IHC boyanmasının karşılaştırılması                                         | 49 |
| <b>Şekil 3.20.</b> Kontrol grubundaki sıçanlara ait aorta kesitinde $\beta_3$ -AR boyanması                      | 50 |
| <b>Şekil 3.21.</b> Diyabetik gruptaki sıçanlara ait aorta kesitinde $\beta_3$ -AR boyanması                      | 51 |
| <b>Şekil 3.22.</b> Sitagliptin tedavili diyabetik gruptaki sıçanlara ait aorta kesitinde $\beta_3$ -AR boyanması | 51 |
| <b>Şekil 3.23.</b> Gruplar arası $\beta_3$ -AR IHC boyanmasının karşılaştırılması                                | 52 |

## ÇİZELGELER

**Çizelge 2.1.** Transfer Çözeltisi Hazırlama Formülü

33



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus insülin eksikliği ya da direncine bağlı olarak gelişen, kronik hiperglisemi ile seyreden ve buna bağlı olarak da göz, sinir sistemi, böbrekler, kalp ve damarlarda ilerleyici kronik hasara yol açan metabolik bir hastalıktır (Al-Awar ve ark., 2016; Deng ve Wang, 2016). Diyabette görülen komplikasyonların başında nöropati, nefropati ve retinopati gelmektedir, buna ek olarak, kardiyovasküler hastalık görülme riski de diyabetik hastalarda artmaktadır (Danaei ve ark., 2011). Diyabetik bireylerde obezite, ateroskleroz, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon ve dislipidemi gibi hastalıkların görülme sıklığı ve söz konusu hastalıkların ilerleme hızı yüksektir (Alexandru ve ark., 2016; Deng ve Wang, 2016; Kozakova ve Palombo, 2016). Diyabetin başlıca bulguları; polifaji (çok yeme), polidipsi (çok su içme) ve poliüridir (çok sık idrara çıkma). Bu klinik bulgular, elbette ki, insülin düzeyi ya da etkinliğinde meydana gelen azalma sonucu ortaya çıkan hipergliseminin sonucudur (van Belle ve ark., 2011).

Amerikan Diyabet Birliği (ADA) 2014 verilerine göre Diabetes Mellitus tanı ve sınıflandırma komitesi diyabet kriterleri açısından bireyleri şu şekilde sınıflandırmaktadır: En az 8 saat açlıktan sonra ölçülen plazma glukozunun 100-125 mg/dl arasında olması “*bozulmuş açlık plazma glukozu (BAPG)*” olarak kabul edilmektedir ve bu değere sahip bireyler “*prediyabetik*” olarak tanımlanmaktadır. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) yapılan bireylerde 2.saatte ölçülen plazma glukozunun 140-199 mg/dl arasında bulunması durumu da “*bozulmuş glukoz toleransı (BGT)*” şeklinde ifade edilmektedir ve bu bireyler de benzer şekilde “*prediyabetik*” olarak kabul edilmektedir. Bu değerlere sahip bireyler klinik olarak diyabet tanısı almasalar da, ilerleyen dönemde diyabet tanısı almaları olasıdır ve buna ek olarak, kardiyovasküler hastalık bakımından da risk grubundadır (ADA, 2014).

Tüm dünyada 347 milyon diyabet hastası olduğu tahmin edilmektedir ve bu sayının 2030 yılında ikiye katlanacağı öngörülmektedir (WHO, 2009). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin 2015 verilerine göre ise dünyada 415 milyon insan diyabet hastasıdır ve bu sayının 2040 yılında 642 milyona ulaşması beklenmektedir. Küresel sağlık harcamalarının %12'sini diyabet nedeniyle yapılan harcamalar oluşturmaktadır ve bu tutar 673 milyar dolar değerindedir (IDF, 2015). Yine aynı verilere göre Türkiye'de diyabet prevalansı %12,5 olarak bulunmuştur. Toplumda 6 milyon 339 bin kişi diyabet hastasıdır ve diyabet nedeniyle yapılan sağlık harcaması kişi başına ortalama 846 dolardır (IDF, 2015).

Diyabet, esas olarak tip 1 diyabet (T1D) ve tip 2 diyabet (T2D) olarak sınıflandırılmıştır. Tip 1 diyabet genel olarak insülin üreten pankreas beta hücrelerindeki harabiyet nedeniyle oluşmaktadır ve bu harabiyetin immün bir bileşenin de olduğu düşünülmektedir (Bluestone ve ark., 2010; Todd, 2010). Dolayısıyla daha yaygın olarak çocuklarda ve gençlerde görülen T1D otoimmün bir hastalık olarak değerlendirilmektedir (Bluestone ve ark., 2010; Todd, 2010; van Belle ve ark., 2011). Pankreas Langerhans adacıklarındaki beta hücreler glukoz duyarlıdır ve kan glukoz seviyesini fizyolojik aralıkta tutmak üzere insülin salıverilmesini düzenlemektedir. Beta hücrelerin harabiyeti durumunda T1D hastalarında kan glukoz düzeyi fizyolojik aralıkta tutulamadığı için ketoasidoz gibi akut komplikasyonlar ile kalp hastalıkları, böbrek hasarı ve körlük gibi ikincil komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır (Bluestone ve ark., 2010).

Öte yandan, T2D, daha çok ileri yaşlarda ortaya çıkan, insülinin hem salıverilmesindeki hem de duyarlılığındaki bozukluğa bağlı gelişen diyabet türüdür (Kahn, 2003; van Belle ve ark., 2011). Çeşitli organlar T2D patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Pankreas, karaciğer, iskelet kası, adipoz doku, hatta gastrointestinal sistem ve santral sinir sistemi arasındaki ilişkinin bozulması glukoz homeostazının bozulmasına ve dolayısıyla T2D oluşumuna neden olmaktadır (Scheen, 2003). İnsülinin çeşitli fonksiyonları arasında glukoz metabolizmasındaki rolü oldukça önemlidir. T2D hastalarında özellikle karaciğer ve iskelet kasında

insülin aracılı glukoz kullanımının büyük ölçüde azaldığı bulunmuştur (Scheen, 2003). Ayrıca hepatik glukoz üretiminin insülin ile düşük oranda inhibe olması müsküler ve hepatik insülin direncinin varlığını göstermektedir (Scheen, 2003). T2D hastalarında insülin direnci, glukoz ve lipid metabolizması ile proinflatuar düzeyde gözlenen bozuklukların ve hipertansiyon gelişiminin altında yatan temel etkindir (Forst ve ark., 2016). Ayrıca insülin direncinin derecesine bağlı olarak bu tip diyabette hiperinsülinemi durumu ortaya çıkmaktadır (Marchetti ve ark., 2008).

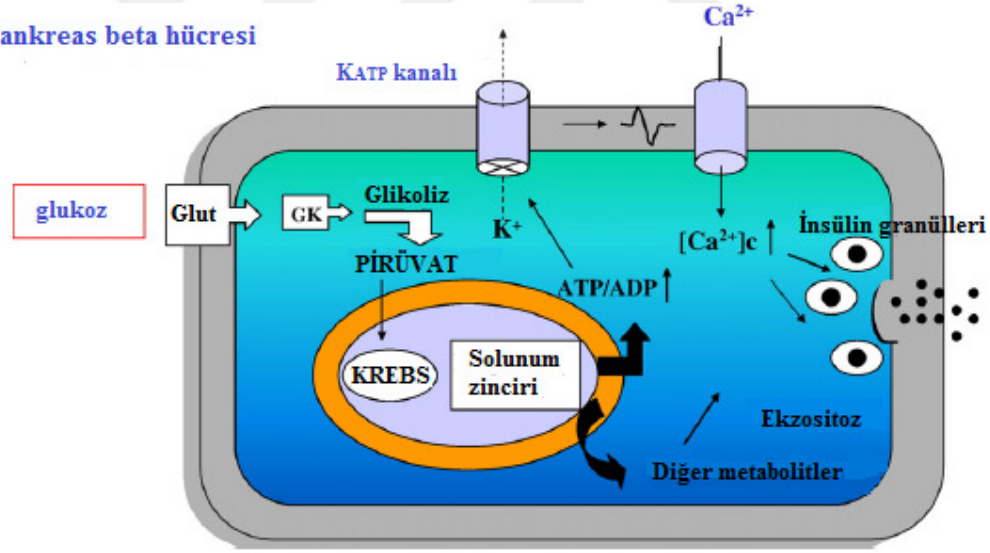
İnsülin direnci, hem T1D'te hem de T2D'te ortak olarak gözlenmektedir ve kardiyovasküler komplikasyonların gelişmesinde belirgin bir rol oynamaktadır. 6 yıldan daha uzun süredir T1D olan hastalarda insülin direncinin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların görülme riskini arttırdığı belirtilmiştir (Sun ve ark., 2016). Obeziteye bağlı olarak gelişen insülin direnci kas ve adipoz hücrelerinin normal düzeydeki insüline duyarlılığının azalmasına yol açmaktadır. Genellikle T2D hastalarının kilolu ya da obez olması, T2D gelişiminde vücut yağ dağılımının da önemli rolü olduğuna işaret etmektedir (Scheen, 2003; van Belle ve ark., 2011).

Normal bir pankreasta glukagon üreten alfa ( $\alpha$ ) hücreleri, insülin üreten beta ( $\beta$ ) hücreleri, somatostatin üreten delta ( $\delta$ ) hücreleri ve pankreatik polipeptid (pp) üreten hücreler gibi çeşitli endokrin işlevleri olan 1 milyona yakın Langerhans adacığı bulunmaktadır (Forst ve ark., 2016; Marchetti ve ark., 2008). Artan kan glukoz düzeyi beta hücrelerinden insülin salıverilmesini uyarırken alfa hücrelerinden glukagon salıverilmesini baskılar. Kan glukoz seviyesindeki azalma ise tersine glukagon salıverilmesini uyarırken insülin salıverilmesini baskılamaktadır. Bu fizyolojik döngüde insülin/glukagon oranı hepatik glukoneogenesis, glikojenolizis ve yağ asidi oksidasyonunun kontrolünde önemli rol oynamaktadır (Forst ve ark., 2016).

İnsülin salıverilmesinde temel uyarıcı glukoz olmasına karşın bazı besinler, hormonlar, nörotransmitter maddeler ve ilaçlar da bu hormonun salıverilmesini indükleyici ve/veya arttırıcı etki gösterebilmektedir (Marchetti ve ark., 2008). Glukoz ile indüklenen insülin salıverilmesinin mekanizması şu şekilde özetlenebilir;

Glukoz taşıyıcıları (GLUT 1, daha çok GLUT 2) aracılığıyla glukoz hücre membranının iki tarafında dengelenir ve glukokinazlar tarafından fosforillenir. Böylece glikoliz yoluyla metabolik akış şekillenir. Azalan bileşikler mitokondride trikarboksilik asit döngüsüyle karbohidratlardan ve yağlardan üretilir. Bu sentezlenen bileşikler elektron transfer zinciri (ETZ)'ne girer. ETZ'den üretilen enerji, mitokondri iç membranından protonların pompalanması için kullanılır ve bu protonlar transmembran elektrokimyasal gradiyentini oluşturur. Bu gradiyent, ADP ve fosfor (P)'un birleşmesiyle ATP oluşumunu sağlar. Böylece sitozolde ATP/ADP oranının artmasıyla ATP aracılı  $K^+$  kanalları kapanarak hücre membranında depolarizasyona neden olur. Bunun sonucunda hücre içine ekstraselüler  $Ca^{2+}$  girişiyle ekzositoz aktivasyonu sağlanır ve insülin granüllerinden insülin salıverilmesi gerçekleşir (Şekil1.1) (Marchetti ve ark., 2008).

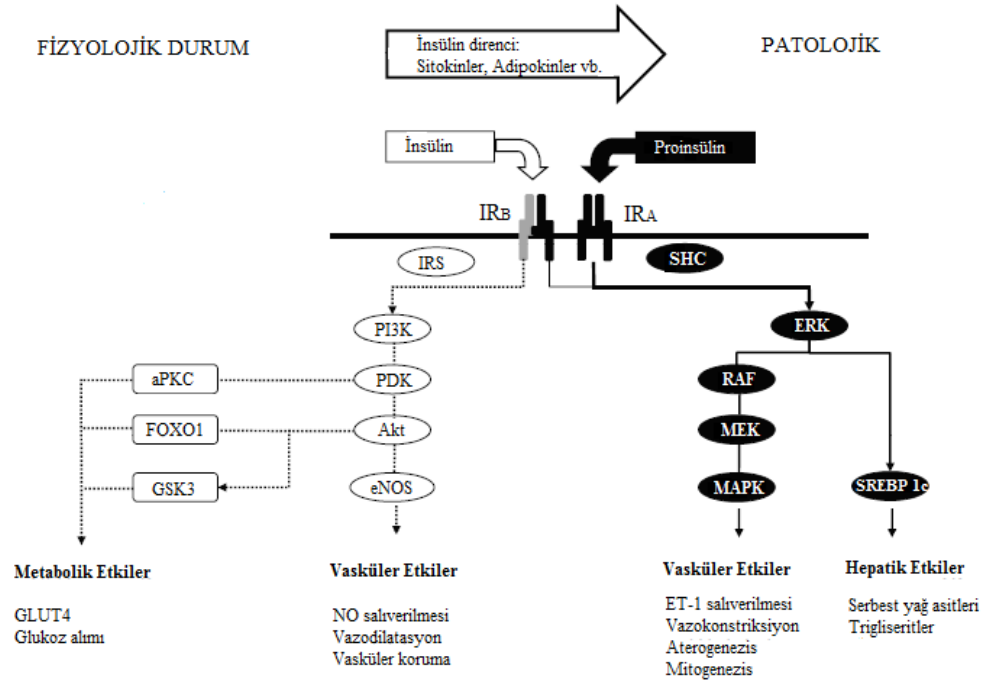
#### Pankreas beta hücresi



**Şekil 1.1.** Glukoz ile indüklenen insülin salıverilmesi şematik gösterimi (Marchetti ve ark., 2008).

İnsülin ile ilişkili hedef hücrelerde bulunan insülin reseptörlerinin aktivasyonu ile farklı intraselüler yollarda sinyal kaskadı başlamaktadır. Kas hücrelerinde fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağının aktive olmasıyla glukoz transporter 4 (GLUT 4) hücre membranı içine doğru yerleşerek hücre içine glukoz moleküllerinin alınmasını sağlar. Endotelial hücrelerde ise PI3K yolağının

aktivasyonu nitrik oksit (NO) salıverilmesine ve bununla beraber vasküler düz kas hücrelerinde gevşemeye neden olur. Buna ek olarak; NO; VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin gibi vasküler adhezyon molekülleri ile etkileşime girer, platelet agregasyonunu ve proinflamatuar aktiviteyi azaltır. Bu intraselüler yolağın ile insülin endotel hücrelerinde anti-aterojenik ve vazoprotektif etki gösterir (Forst ve ark., 2016; Hsueh ve ark., 2004; Loscalzo, 1995). Öte yandan yüksek insülin konsantrasyonları endotelial hücrelerde MAPK/ERK sinyal yolağı, karaciğerde sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein (SREBP)-1c yolağı gibi alternatif sinyal yollarını aktive ederek endotelial disfonksiyona ve birtakım lipid anormalliklerine neden olmaktadır (Montagnani ve ark., 2002; Shimomura ve ark., 2000) (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** İntraselüler insülin sinyal kaskadının çeşitli dokulardaki şematik gösterimi. (Akt: Protein kinaz B, aPKC: atipik protein kinaz C, eNOS: endotelial nitrik oksit sentaz, ERK: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz, ET-1: Endotelin 1, FOXO1: Forkhead box protein O1, GLUT4: Glukoz transporter 4, GSK3: Glikojen sentaz kinaz 3, IR: İnsülin reseptörü, IRS: İnsülin reseptör substratı, MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz, MEK: Mitojen aktive edici protein kinaz, NO: Nitrik oksit, PDK: Fosfoinositid bağımlı kinaz, PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinaz, RAF: Proto-onkogen, SHC: Adaptör protein, SREBP 1c: Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1c) (Forst ve ark., 2016).

Tip 2 diyabette kardiyovasküler komplikasyonların görülme riski diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak 2 kat daha fazladır (Sarwar ve ark., 2010). Bu risk genel olarak hiperglisemi ve damar üzerindeki oksidatif stres nedeniyle oluşmaktadır (Avogaro ve ark., 2011). Ayrıca prediyabetik durumda gözlenen bozulmuş açlık glukozu ve glukoz toleransı da kardiyovasküler hastalık riskini arttırmaktadır (Kirpichnikov ve Sowers, 2001). Bu bulgular göstermektedir ki, karbonhidrat metabolizmasındaki bozukluklar kardiyovasküler sağlığı olumsuz etkilemektedir. Koroner arter hastalığı, periferik vasküler ve serebrovasküler hastalıklar gibi ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği, inme gibi kardiyovasküler sorunlar diyabet hastalarında sıklıkla gözlenmektedir (Avogaro ve ark., 2011; Kirpichnikov ve Sowers, 2001). Tip 2 diyabet için ideal farmakoterapinin amacı yalnızca kan glukoz seviyelerini düşürmek değil, aynı zamanda kardiyovasküler komplikasyonların görülmesini engellemek olmalıdır (van Poppel ve ark., 2011). Hipergliseminin indüklediği vasküler hasar lipoproteinler dahil pek çok vasküler proteinin glikasyonu, endotelial disfonksiyon ve oksidatif stresten kaynaklanmaktadır (Kirpichnikov ve Sowers, 2001). Aterosklerotik prosesin temelinde endotelial disfonksiyon olduğu düşünülmektedir (Avogaro ve ark., 2006).

### **1.1.1. Diabetes Mellitus'un Vasküler Komplikasyonları**

Diyabetin vücutta kronik dönemde yol açtığı komplikasyonlar vasküler sistem üzerinde oldukça etkilidir. Glukoz alımının insülin aktivitesinden bağımsız olduğu böbrek, retina, vasküler endotelium gibi dokularda mikrovasküler komplikasyonların görülme eğilimi özellikle fazladır, çünkü bu dokuların glukoz maruziyeti kandaki glukoz seviyeleri ile yakından ilişkilidir. Diyabette görülen metabolik hasar kan akışının, endotel geçirgenliğinin, ekstrasvasküler protein birikiminin ve koagülasyonun değişmesine yol açarak organ fonksiyon bozukluklarına, dolayısıyla mikrovasküler komplikasyonların gelişmesine neden olmaktadır (Khalil, 2016).

Hiperglisemiye bağlı oluşan hasarın hedef hücreleri; özellikle retinada bulunan kapiller endotelial hücreler, böbrek glomerülünde bulunan mezengial hücreler,

nöronlar ve periferik sinirlerdeki Schwann hücreleridir. Glukoz transport mekanizmaları sayesinde internal glukoz oranını sabit tutabilen hücrelerin aksine söz konusu hücrelerde hücre içi glukoz miktarı hiperglisemi nedeniyle yükselmektedir ve bu hücre içi hiperglisemik ortam mikrovasküler hasarın gelişimine yol açmaktadır (Khalil, 2016).

Vasküler hasar oluşumunda esas kriter olan endotelial disfonksiyon deneysel diyabet modellerinde ve klinik çalışmalarda ayrıntılı olarak incelenmiştir. Diyabetik makrovasküler hastalıklar hem morfolojik hem de fonksiyonel olarak kardiyovasküler risk faktörlerinin başında gelen aterosklerotik lezyonlarla benzerlik gösterir. Öte yandan, retinopati, nefropati, nöropati ve alt ekstremitelerde vasküler anomaliler gibi komplikasyonlarla kendini gösteren diyabetik mikrovasküler hastalıklar sırasıyla görme bozukluklarına, böbrek yetmezliğine, inmeye, diyabetik kardiyomiyopatiye ve alt ekstremitte disfonksiyonuna yol açmaktadır (Shi ve Vanhoutte, 2017).

Diyabetik mikrovasküler hastalıklarda endotelial disfonksiyon NO salıverilmesinde azalma, inflamatuvar faktörlerin üretiminde ve oksidatif strese artış, fizyolojik sınırın üstünde anjiyogenezis ve endotelial tamir mekanizmalarında meydana gelen bozukluk ile karakterizedir. Diğer yandan, diyabetik makrovasküler hastalıklarda endotelial disfonksiyonun temel karakteristikleri arasında NO biyoyararlanımında azalma, buna eşlik eden kompensatuvar prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü (EDHF) üretiminde artış ve endotel kaynaklı vazokonstriktörlerin üretiminde veya aktivitelerinde görülen artış sayılabilir (Shi ve Vanhoutte, 2017).

Diyabet ve metabolik sendrom gibi patolojilerde çeşitli vasküler yataklarda endotelyuma bağımlı gevşeme yanıtlarının bozulduğu bildirilmiştir (Bonetti ve ark., 2003; De Vriese ve ark., 2000; Shi ve Vanhoutte, 2009; Shi ve Vanhoutte, 2017; Verma ve Anderson, 2002). Diyabette oluşan hiperglisemi, serbest yağ asitlerinin aşırı salıverilmesi, insülin direnci, kompensatuvar hiperinsülinemi gibi metabolik

dengesizlikler, NO sentezini ya da yıkımını düzenleyen moleküler mekanizmaları bozarak endotelyumu etkilemektedir. Bu durumda endotelyumun düzenleyici rolünün kaybolması diyabetik vasküler hastalıkların gelişmesinde başlıca önemli faktör olarak görünmektedir (De Vriese ve ark., 2000; King, 1996; Zeydanli ve ark., 2010). Bu nedenle vasküler hasarın oluşumunun önlenmesi veya tedavisi için endotelyal disfonksiyon konusu üzerine yoğunlaşmak önem taşımaktadır.

### **1.1.2. Endotelyal Disfonksiyon**

Furchgott ve Zawadzki'nin 1980 yılında vasküler duvarı içten saran bir tabaka olan endotelyumun lokal vasküler tonusun düzenlenmesinde etkin rolünün olduğunu göstermelerinden bu yana, hem fizyolojik hem de patolojik durumda endotelyumun önemi üzerine çalışılmaktadır (Furchgott ve Zawadzki, 1980; Shi ve Vanhoutte, 2017). Endotelyumun damarın gevşemesini sağlayan araçları salıvererek vazoprotektif ve homeostatik etki göstermek, vasküler tonusu ve aktiviteyi düzenlemek gibi görevleri bulunmaktadır. Ne var ki, farklı patofizyolojik durumlarda endotelyal fonksiyonun irdelenmesi açısından hem kolay uygulanabilir olması hem de tekrarlanabilir bir parametre olması nedeniyle, endotelyal fonksiyon genellikle endotelyum aracılı gevşeme yanıtları üzerinden değerlendirilmektedir (De Vriese ve ark., 2000).

Sağlıklı bireylerde kan damarları; endotel hücreleri (tunica intima), damar düz kas hücreleri (tunica media) ve ekstraselüler matriks (tunica adventitia) olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Endotelyum, vasküler lümeni saran tek katlı hücrelerden oluşmaktadır ve vasküler düz kas hücreleri ile kan arasında bir ara yüzey gibi davranmaktadır. Arterlerde, venlerde ve beyin, kalp, kas, cilt, akciğerler gibi pek çok organın kapillerlerinde endotelyum tabakası bulunmaktadır (Delbin ve Trask, 2014; Feletou, 2011; Lau ve ark., 2015).

Endotel hücreleri, fizyolojik durumda vasküler homeostazın devamlılığını sağlayan parakrin, endokrin ve otokrin işlevleri yerine getirir. Genel olarak; vasküler tonusun ve vasküler geçirgenliğin düzenlenmesi, endotelyum kaynaklı vazoaaktif maddelerin salıverilmesi, endojen ve ekzojen maddelerin metabolizması, platelet agregasyonunun ve lökosit adhezyonunun önlenmesi, hücre proliferasyonunun gerçekleştirilmesi gibi görevlerin yerine getirilmesinden sorumludur (Aird, 2007; Bonetti ve ark., 2003; Delbin ve Trask, 2014; Feletou, 2011; Feletou ve ark., 2008; Shi ve Vanhoutte, 2017; Vallance, 2001). Endotelyum kaynaklı gevşeme veya kasılma faktörlerini salıvermek suretiyle vasküler tonusun ayarlanmasında; prokoagülan, antikoagülan, fibrinolitik ve inflamatuvar faktörleri salıvermek suretiyle de hemostazın, trombozun ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde rol oynar (Feletou ve ark., 2008; Lau ve ark., 2015). Normal şartlar altında endotelyal hücreler, diğer mediatörlere nazaran endotel kaynaklı gevşeme faktörlerini ve antikoagülan faktörleri salıvermeyi tercih eder; ancak patofizyolojik durumlarda oksidatif stresin etkisiyle endotelyum fenotipinde gözlenen modifikasyonlar nedeniyle vazokonstriksiyon, inflamasyon ve tromboz oluşturmaya daha yatkın hale geçer (Lau ve ark., 2015).

Endotelden salıverilen endotelin-1, prostaglandinler, anjiyotensin II, tromboksan A2, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi mediatörler damar kasılma yanıtlarına aracılık ederken; nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI2), endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü (EDHF) gibi mediatörler damar gevşeme yanıtına yol açarlar (Lau ve ark., 2015; Vanhoutte ve Mombouli, 1996). Bunun yanı sıra endotel hücreleri, vazoaaktif özellikte olsun ya da olmasın pek çok polipeptid hormon, amin, lipoprotein, nükleotid gibi dolaşım faktörlerinin aktivasyonu veya metabolizasyonunda da rol oynar. Bu faktörlerden bazıları monoamin oksidaz (MAO), anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), katekol-o-metil transferaz (COMT), endotelin dönüştürücü enzim (ECE), dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) olarak sıralanabilir (Feletou, 2011).

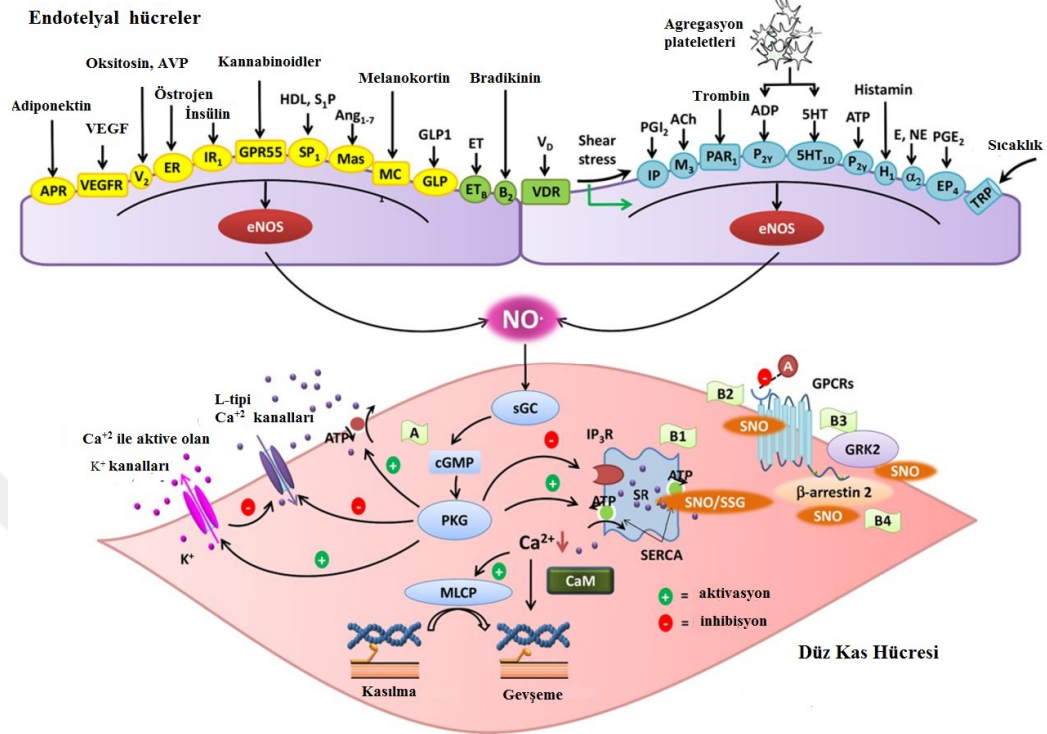
Endotelyum son derece dinamik bir doku olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli biyokimyasal ve biyomekanik verileri alarak onlara kanda koagülasyon, lökosit transvasküler migrasyonu gibi; damar çeperinde ise düz kas kasılma tonusunu ayarlamak, vasküler remodeling ve geçirgenliği düzenlemek, ekstraselüler matriks bileşimini değiştirmek gibi çeşitli biyokimyasal sinyallerle yanıt vermektedir (Mas, 2009). Özellikle 1980’li yıllarda endotelyum aracılı gevşeme yanıtlarından sorumlu ana mediatörün nitrik oksit (NO) olduğunun bulunması ve endotelyal disfonksiyonun önemli bir patolojik mekanizma olduğunun anlaşılması endotelyum üzerine yapılan çalışmalarda dönüm noktası olmuştur (Mas, 2009).

Nitrik oksit (NO); özellikle arterlerde endotelyumdan salıverilen ana vazodilatör elementtir. Hücre membranından kolayca difüze olabilen görece stabil bir gazdır (Stankevicius ve ark., 2003). Çeşitli hücre içi moleküllerle etkileşime girerek hemostaz, fibrinolizis, arter çeperi ile lökosit/plateletlerin etkileşimi, vasküler tonusun düzenlenmesi, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu, kan basıncı homeostazı gibi pek çok fizyolojik olayda önemli rol oynar (Napoli ve Ignarro, 2009; Stankevicius ve ark., 2003). Ayrıca NO, mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyonu sınırlayarak oksidasyon/redüksiyon dengesini de düzenler (Moncada ve Erusalimsky, 2002).

Kardiyovasküler sistemde endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS), nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere üç çeşit nitrik oksit sentaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzimlerden eNOS  $Ca^{+2}$  bağımlı olarak etki gösterirken, iNOS etkisini  $Ca^{+2}$ ’dan bağımsız olarak gösterir (Jin ve ark., 2011; Rameshrad ve ark., 2016). Vücutta NO üretilmesine aracılık eden pek çok farklı uyarıcı bulunmaktadır. eNOS enzimi, fizyolojik koşullarda esas olarak kesme gerilimi (shear stress) ile aktive olan ve NO üretimine aracılık eden bir enzimdir. Bunun dışında, asetilkolin, P maddesi, bradikinin, histamin, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), insulin, serotonin gibi sinyal molekülleri de en çok bilinen uyarıcılar olarak karşımıza çıkmaktadır (Govers ve Rabelink, 2001; Rameshrad ve ark., 2016). Endotelyumda PI3/Akt sinyal yolağı ile aktive olan eNOS enzimi, L-

arjininin oksidasyonunda rol oynamaktadır ve bu reaksiyon sırasında NADPH, FAD, tetrahidrobiopterin (BH4) gibi kofaktörlerin varlığında L-arjinin L-sitrüline dönüşürken reaktif bir gaz olan NO açığa çıkmaktadır (Furchgott ve Zawadzki, 1980; Griffith ve Stuehr, 1995; Jin ve ark., 2011; Rameshrad ve ark., 2016).

NO,  $Ca^{+2}$ /kalmodulin bağımlı ya da bağımsız sinyal yolları ile etkisini gösterebilir (Jin ve ark., 2011). Üretilen NO endotelial hücrelerden damar düz kas hücrelerine difüze olur ve burada çözünür guanilil siklazın (sGC) hem kısmına bağlanarak GTP'nin siklik guanin monofosfata (cGMP) dönüşmesine aracılık eder, böylece protein kinaz G (PKG) aktivasyonu sağlanır (Munzel ve ark., 2003; Rameshrad ve ark., 2016). PKG, hücre içine  $Ca^{+2}$  girişini inhibe ederek hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyelerinde azalmaya neden olur. Bu azalma sonucu kontraktıl elementlerin  $Ca^{+2}$ 'a olan afinitesi azalır ve  $Ca^{+2}$  kontraktıl elementlerden ayrılır. Böylece vazodilatasyon gerçekleşir. Diğer yandan PKG, sarkoendoplazmik retikulum  $Ca^{+2}$  ATPaz (SERCA) fosforilasyonu ile sitozolik  $Ca^{+2}$  seviyelerini azaltır (Rameshrad ve ark., 2016). cGMP ile aktive olan myosin hafif zincir fosfatazlar (Moncada ve Higgs, 1993) ve ATP aracılı potasyum (K-ATP) kanalları (Sasaki ve ark., 2000) aracılığıyla da vazodilatasyon gerçekleşir. NO, hem ATP aracılı hem de  $Ca^{+2}$  ile aktive olan potasyum ( $K^{+}$ ) kanallarını açarak hücre membranında hiperpolarizasyona neden olmaktadır. Böylece voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanalları üzerinden hücre içine  $Ca^{+2}$  girişini azaltarak doğrudan vazodilatasyon gerçekleştirir (Şekil 1.3.) (Rameshrad ve ark., 2016). Ayrıca hücre içi cGMP seviyelerinin artması nitro-oksidatif strese karşı koruyucu etki göstermektedir (Rameshrad ve ark., 2016).



**Şekil 1.3.** Endotel kaynaklı NO ile vasküler tonusun düzenlenmesi şematik gösterimi.  $\alpha$ :  $\alpha$  adrenerekjik reseptör, 5HT: Serotonin, 5HT1D: Serotoninerjik reseptör 1D alt tipi, ACh: Asetilkolin, Ang1-7: Anjiyotensin 1-7, APR: Adiponektin reseptörü, AVP: Arjinin vazopressin, B: Bradikinin reseptörü, E: Epinefrin, EP4: Prostaglandin E2 reseptör 4, ER: Nongenomik östrojen reseptörü, ET: Endotelin, ETB: Endotelin B tipi reseptörü, GLP: Glukagon benzeri peptid 1 reseptörü, GPR55: G protein kenetli reseptör 55, H: Histamin reseptörü, IP: Prostaglandin reseptörü, IR1: İnsülin reseptörü, M: Muskarinik reseptör, Mas: Mas reseptörü, MC: Melanokortin reseptörü, NE: Norepinefrin, P: Pürinerjik reseptör, PAR: Proteaz aktive edici reseptör, SP1: Sfingozin 1 fosfat, TRP: Transient potansiyel reseptör V4, V: Vazopressin reseptörü, VEGFR: vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü, VDR: Vitamin D reseptörü (Vanhoutte ve ark., 2016).

NO biyoyararlanımı, sağlıklı vasküler fonksiyonun belirteçidir (Creager ve ark., 2003). Endotelial disfonksiyon; endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesinin azalması, NO sentezi için gereken kofaktörlerin eksikliği, NO salıverilmesinde düşüş veya NO degradasyonunda artış görülmesi gibi durumlarla NO biyoyararlanımının azalması sonucu vasküler tonusun düzenlenmesinde bozukluk meydana gelmesi ile karakterize edilmektedir (Creager ve ark., 2003; Radenkovic ve ark., 2013). Hüresel ve deneysel diyabet modellerinde, ayrıca hipertansiyon, obezite, hiperkolesterolemi gibi patolojilerde endotelial disfonksiyon, ateroskleroz vb. klinik kardiyovasküler belirtilerin gözlendiği açıkça ortaya

konmuştur (Creager ve ark., 2003; Radenkovic ve ark., 2013). Bu bulguların yanı sıra, pek çok klinik çalışmada da tip-1 ve tip-2 diyabet hastalarında endotelyum kaynaklı vazodilatasyon yanıtlarında anormallik görüldüğü bildirilmiştir (Creager ve ark., 2003).

Endotelial disfonksiyon özellikle diyabetik vasküler komplikasyonların başında gelmektedir. İnsülin direnci, glukotoksisite ve lipotoksisite pro-inflamatuar ve oksidatif yollarla değişen endotelial fonksiyonu beraberinde getirmektedir (Potenza ve ark., 2009). Endotel kaynaklı NO'nun azalması, değişen glukoz ve lipid metabolizması nedeniyle ROS üretiminin artmasına bağlı olarak NO sentezinin, salıverilmesinin ya da biyoyararlanımının azalmasından kaynaklanır (Potenza ve ark., 2009). Deneysel diyabet modellerinde insülin duyarlılığındaki düşüş ile NO biyoyararlanımının azalması arasında patofizyolojik bir ilişki olduğu bulunmuştur. NO biyoyararlanımının azalması ve süperoksit anyonlarının ( $O_2^-$ ) üretiminin artması diyabetik durumda vasküler hasarın işaretidir (De Vriese ve ark., 2000).

Hiperglisemi, çeşitli hücresel olaylarla endotel hücrelerinden üretilen bir süperoksit olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu indüklemektedir. Bu indüksiyon mitokondriyal elektron taşıma zinciri üzerinden başlamaktadır ve oluşan süperoksit anyonları çeşitli elementlerle bağlanarak endotelial kaskada dahil olmaktadır (Creager ve ark., 2003; Nishikawa ve ark., 2000a). Hipergliseminin neden olduğu vasküler hasarı açıklamak için poliol yolağının aktivasyonu, enzimatik olmayan glikasyon, redoks olasılıklı değişimler, diaçilgliserol (DAG)- protein kinaz C (PKC) yolağının uyarılması gibi farklı hipotezler oluşturulmuştur (Hink ve ark., 2001).

Poliol teorisi ile sıçanlarda sorbitol üretiminin ve akışının artmasının diyabetik komplikasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (Ishii ve ark., 1998). Enzimatik olmayan glikasyon teorisi, glukozun proteinlerin primer aminleriyle kovalent bağlarla etkileşime girmesi sonucu glikasyon ürünleri oluşturması temeline dayanmaktadır. Oluşan glukoz protein kompleksleri direkt olarak ya da oksidasyon

ürünleri oluşturarak vasküler anomalilere neden olmaktadır (Ishii ve ark., 1998). Diyabetle ilişkilendirilen vasküler komplikasyonları açıklamada güçlü bir rolü olduğu düşünülen DAG-PKC yolağı da odaklanılan bir diğer hipotezdir (Hink ve ark., 2001; Ishii ve ark., 1998). Hiperglisemiye bağlı olarak DAG üretiminde artış gözlenmekte ve oluşan DAG, PKC aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktive olan PKC, fosfatidilinositol 3 kinaz yolağını inhibe ederek Akt kinaz aktivasyonunu ve sonrasında NOS'un fosforilasyonunu sınırlandırarak NO üretiminin azalmasına yol açmaktadır (Creager ve ark., 2003). Glukoz ile aktive olan protein kinaz C (PKC), membrana kenetli NADPH-bağımlı oksidazları aktive etmekte ve devamında süperoksit anyonları oluşmaktadır. Oluşan ROS ile endotelden salıverilen NO'nun reaksiyonu sonucu kararsız bir molekül olan sitotoksik peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) meydana gelmektedir. Peroksinitrit, NOS enziminin kofaktörü olan tetrahidrobiopterini okside ederek enzim kenetlenmesini bozmakta (uncoupling) böylece süperoksit anyonlarının seviyeleri daha da artmakta ve NO inaktif olmaktadır (Creager ve ark., 2003). Hipergliseminin indüklediği oksidatif stres aynı zamanda NOS'un kompetitif antagonisti olan asimetrik dimetilarjininin (ADMA) metabolize olmasını engelleyerek ADMA seviyelerinde artışa neden olmaktadır (Creager ve ark., 2003; Lin ve ark., 2002).

NO seviyelerinin azalarak peroksinitrit seviyelerinin artması damar gevşeme yanıtlarının bozulmasına ve sonuç olarak kardiyovasküler komplikasyonların gelişmesine neden olmaktadır (Mason ve ark., 2012; Mason ve ark., 2011). Bu nedenle, NO seviyelerindeki azalmanın önlenerek endotel fonksiyonunun iyileştirilmesi, vasküler hasarın düzeltilmesinde önemli bir yaklaşım olarak görünmektedir.

### **1.1.3. Nitrik Oksit Salıverilmesini Arttıran Faktörler**

Endotelyumdan NO salıverilmesini arttıran çeşitli faktörlerden bulunmaktadır. Bunlardan ilkinin damarlardan akan kanın endotel hücrelerde oluşturduğu güç olarak tanımlayabileceğimiz kesme gerilimi oluşturmaktadır. Shear stres eNOS oluşumunu

ve aktivitesini arttırarak NO salıverilmesinde artışa, böylece akış aracılı vazodilatasyona neden olmaktadır (Vanhoutte ve ark., 2017).

NO prekürsörü olan L-arjininin akut uygulanmasıyla insanlarda endotelyum bağımlı gevşeme yanıtlarının arttığı gösterilmiştir (Perticone ve ark., 2005). Diğer yandan NO oluşumunda esansiyel kofaktör olan tetrahidrobiopterinin (BH4) eksikliği ya da seviyelerinin düşük olması NO aracılı endotelyum bağımlı gevşeme yanıtlarında azalmaya neden olmaktadır (Vanhoutte ve ark., 2017). BH4 verilen sıçanlarda vasküler NO/cGMP sinyal yolağının aktivasyonunda artış gözlenmiştir (Kang ve ark., 2011).

Bir diğer faktör olarak insülin, eNOS ekspresyonunu arttırarak NO aracılı vazodilatasyonu arttırmaktadır (Fisslthaler ve ark., 2003). Bundan başka GLP-1, hem endotelyum bağımlı NO aracılı gevşeme yanıtlarını iyileştirmekte hem de eNOS protein ekspresyonunu ve aktivitesini arttırmaktadır (Ding ve Zhang, 2012; Osto ve ark., 2015). Buna paralel olarak GLP-1'in yıkımından sorumlu olan DPP4 enziminin inhibisyonu da endotelial disfonksiyonu düzeltmektedir (Liu ve ark., 2012; Matsubara ve ark., 2012; Salheen ve ark., 2015).

## **1.2. İncretin Mimetikler**

İncretin mimetikler, GLP-1, GIP gibi incretin hormonları taklit ederek etki gösteren yeni antidiyabetik ilaç sınıfıdır. DPP4 inhibitörleri, GLP-1'in de yer aldığı incretinlerin parçalanmasını önleyerek, bu hormonların biyoaktivitelerini arttırmakta, böylece incretin etki göstermektedirler (Nielsen, 2005).

İncretin mimetikler etkilerini; glukoz bağımlı insülin salıverilmesini arttırarak, glukagon sekresyonunu baskılayarak, gastrik boşalmayı yavaşlatarak, besin alımını azaltarak göstermektedir (Nielsen, 2005).

Oral yolla bolus glukoz verildikten sonra pankreas beta hücrelerinden salıverilen insülin seviyelerinin, aynı miktar intravenöz bolus glukoz injeksiyonundan sonra gözlenen insülin seviyelerinden fazla olması, postprandial insülin salıverilmesinde bağırsak hormonlarının rolünü gündeme getirmiştir (Holst ve Gromada, 2004). Bağırsak hormonlarının insülinotropik etkileri “inkretin etki” olarak kabul edilmiştir (Holst ve Gromada, 2004; Nielsen, 2005).

Tip 2 Diyabet hastalarında genel olarak GIP’e bağlı glukoz düşürücü etki izlenememektedir, ancak GLP-1’in insülinotropik etkisi görülmektedir. Bu nedenle terapötik hedefler GLP-1 üzerinde yoğunlaşmıştır (Nielsen, 2005).

### **1.2.1. GLP-1 Analogları**

Glukagon benzeri peptid (GLP-1), ince bağırsak L hücrelerinden salıverilen bir proglukagon peptiddir. GLP-1(7-36) amid ve GLP-1(7-37) amid olmak üzere iki formu bulunan bu hormonun, yemek sonrası dolaşımda bulunan formu GLP-1 (7-36)’dır (Drucker ve Nauck, 2006). Yemekten sonra plazma GLP-1 düzeyleri hızla artmaktadır (yaklaşık 10 dk), ancak, GLP-1, DPP4 enzimi ile kısa sürede (2 dk) parçalanmakta ve inaktif form olan GLP-1(9-36)’ya dönüşmektedir, bu nedenle etkisi kısa sürmektedir (Drucker ve Nauck, 2006; Holst ve Gromada, 2004; Nielsen, 2005).

GLP-1’in hızla parçalanması sorunu DPP4 enzimine dirençli olan ya da farmakokinetik özelliklere uygun olarak daha büyük moleküllü olan GLP-1 reseptör agonistlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Kertenkele venomundan elde edilen parçalanmaya dirençli exenatid ve DPP4’ e dirençli liraglutid bilinen GLP-1 analoglarıdır (Drucker ve Nauck, 2006).

GLP-1R agonistleri, G protein kenetli reseptör ailesinden olan GLP-1 reseptörlerine (GLP-1R) bağlanarak etki oluşturmaktadır (Drucker ve Nauck, 2006).

GLP-1R'leri pankreas  $\alpha$  ve  $\beta$  adacık hücrelerinde, santral ve periferik sinir sisteminde, kalpte, akciğerlerde, böbreklerde, gastrointestinal kanalda (Drucker ve Nauck, 2006), ayrıca vasküler düz kas hücrelerinde (Ban ve ark., 2008) bulunmaktadır. GLP-1R aktivasyonu Gs proteini üzerinden adenilat siklazin aktivasyonu ile gerçekleşmekte cAMP/PKA sinyal yolağıyla biyolojik yanıt görülmektedir (Ban ve ark., 2008; Drucker ve Nauck, 2006).

### 1.2.2. Dipeptidil Peptidaz 4 (DPP4) İnhibitörleri

Dipeptidil peptidaz 4 (DPP4), vücutta ya plazmada çözünür formda bulunan ya da endotelial hücreler dahil pek çok hücre membranında bir transmembran proteini olarak yerleşen, serin peptidaz fonksiyonu sergileyen bir glukoproteindir (Holst, 2004; Matheeußen ve ark., 2011; Son ve Kim, 2015). CD26 veya adenosin deaminaz bağlayıcı protein (ADA bp) olarak da bilinmektedir (Durinx ve ark., 2000). Sıçanlarla yapılan çalışmada böbrek, ince bağırsak ve akciğer membranlarında yüksek miktarda, karaciğer membranında orta miktarda, kalp ve dalak membranlarında az miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Hong ve ark., 1989). DPP4, hücre membranı ile ilişkili hücre içi sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonu, hücre-hücre etkileşimi, enzimatik aktiviteler gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda rol oynamaktadır (Drucker ve Nauck, 2006).

DPP4'ün en çok çalışılan substratları glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve glukoz bağımlı insülinotropik peptid (GIP)'dir. DPP4'ün inhibisyonu, GLP-1 ve GIP gibi inkretinlerin parçalanmasını önleyerek dolaşımdaki inkretin seviyelerini artırır. Artan inkretin seviyeleri, yemek sonrası insülin etkinliğinin uzamasını sağlamaktadır (Rohrborn ve ark., 2015). Bu etkisiyle DPP4 inhibitörleri günümüzde diyabet tedavisi için kullanılmaktadır (Drucker ve Nauck, 2006; Kubota ve ark., 2012; Rohrborn ve ark., 2015; Shah ve ark., 2011b).

DPP4, peptidlere N ucundan 2.pozisyonundaki alanin veya prolin aminoasitleriyle bağlanmaktadır (Thornberry ve Gallwitz, 2009; Ussher ve Drucker, 2012; Ussher ve Drucker, 2014). Benzer şekilde GLP-1'e bağlanarak birkaç dakika içinde onu inaktive etmektedir. Bu hızlı bağlanma ve inaktivasyon nedeniyle parenteral verilen GLP-1'in diyabet tedavisinde devamlı kullanımı pek makul görünmemektedir. Böylece DPP4 inhibitörleri alternatif tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır. DPP4 inhibitörleriyle biyolojik olarak aktif GLP-1 plazma seviyeleri artarken aynı zamanda GIP ve glukoz homeostazını düzenleyen bazı peptidlerin de parçalanması önlenmektedir. Böylece DPP4 inhibitörlerinin ekstra yararlı etkileri olduğunu düşünmek mümkündür (Thornberry ve Gallwitz, 2009). Bununla birlikte oral olarak uygulanması, inkretin mimetiklere göre DPP4 inhibitörlerinin kullanımını kolaylaştırmaktadır (Drucker ve Nauck, 2006).

Sitagliptin, vildagliptin, alogliptin ve saksagliptin DPP4'e yüksek affinitesi olan yarışmalı inhibitörlerdir. İnsanlarda farmakokinetik/farmakodinamik özellikler, etkililik, güvenlik bakımından daha çok sitagliptin ve vildagliptin ile çalışmalar yapılmıştır (Ahren, 2008). Klinik çalışmalarda DPP4 inhibitörlerinin iyi tolere edildiği, hipoglisemiye neden olmadığı ve kilo aldırmadığı gösterilmiştir (Ahren, 2008). Sitagliptin, FDA tarafından 2006 yılında hem monoterapi olarak, hem de metformin veya tiazolidindion ile kombine tedavi olarak kullanım için onay almıştır. Sonrasında bu ilaçların sülfonilüre ve sülfonilüre + metfomin tedavilerine eklenmesi kararı onaylanmıştır (Thornberry ve Gallwitz, 2009).

Çeşitli prelinik çalışmalar ve bazı gözlemsel çalışmalar sonucunda DPP4 inhibitörlerinin kardiyovasküler (KV) risk faktörleri ve kardiyovasküler patolojilerin mekanizması üzerinde olumlu etkileri olabileceği gösterilmiştir (Son ve Kim, 2015). DPP4 inhibitörlerinin GLP-1 bağımlı KV etkileri, plazma glukoz ve lipid düzeylerini azaltmasıyla ya da kardiyomyositler ve vasküler çeper üzerindeki direkt etkisiyle oluşmaktadır. Ancak GLP-1'in yanı sıra DPP4 inhibitörleri, stromal hücre kaynaklı faktör  $1\alpha$ , B tipi natriüretik peptid (BNP), nöropeptid Y, P maddesi, bradikinin gibi

vazoaktif ve muhtemel kardiyoprotektif etkili peptidlerin seviyelerini arttırarak da KV etkilerini gösterebilmektedir (Son ve Kim, 2015).

#### **1.2.2.1. DPP4 İnhibitörlerinin Vasküler Sistem Üzerine Etkileri**

DPP4, yalnızca inkretinleri değil; inflamasyon, immünite ve vasküler fonksiyonları düzenleyen çeşitli sitokinleri, kemokinleri ve nöropeptidleri de inaktive etmektedir (Fadini ve Avogaro, 2011). Dolayısıyla glukoz homeostazının düzenlenmesi yanında inflamasyon, immünite, vasküler ve kardiyak fonksiyonlar üzerinde de DPP4 enziminin fizyolojik rolü vardır (Fadini ve Avogaro, 2011; Vanderheyden ve ark., 2009). Bu bilgilerden yola çıkarak, DPP4 inhibitörlerinin çeşitli organlardaki anti-diyabetik özelliklerinden bağımsız etkileri üzerinde de araştırmalar devam etmektedir (Rohrborn ve ark., 2015). Bu çalışmalar DPP4 inhibitörlerinin anti-inflamatuar, anti-aterosklerotik ve damar gevşeme yanıtını arttırıcı etkileriyle vasküler sistem üzerinde koruyucu özelliği olduğunu ortaya koymuştur (Matsubara ve ark., 2012; Shah ve ark., 2011a). DPP4 inhibitörleri bu koruyucu etkileri GLP-1'e bağımlı ya da GLP-1'den bağımsız olarak gerçekleştirmektedir (Silva Junior ve ark., 2015).

DPP4 inhibisyonu ile endotel disfonksiyonunun ve aterogenezin azalması ilişkili bulunmuştur (Hu ve ark., 2013). GLP-1 analogu exendin-4 ile yapılan damar çalışmalarında exendin-4 infüzyonunun aortik endotel hücrelerinde monosit adhezyonunu ve TNF alfa, MCP-1 gibi öncü inflamatuvar sitokinleri azalttığı (Arakawa ve ark., 2010), ayrıca insan koroner arter endotel hücrelerinde e-NOS, protein kinaz A (PKA), PI3K/Akt sinyal yolları üzerinden proliferasyonu uyardığı (Erdogdu ve ark., 2010; Fadini ve Avogaro, 2011) gösterilmiştir.

Aorta halkalarıyla yapılan deneyde alogliptinin doz bağımlı olarak gevşeme yanıtlarına aracılık ettiği gösterilmiştir (Shah ve ark., 2011b). Gözlenen bu gevşemenin GLP-1'den bağımsız olarak gerçekleştiği, yanıtın endotel kaynaklı NO

ve EDHF aracılı mekanizmalar ile sağlandığı bildirilmiştir (Shah ve ark., 2011b). Diğer yandan apoE-eksik farelerde des-fluoro sitagliptinin GLP-1 aktivitesini arttırarak cAMP/PKA yolağı üzerinden eNOS fosforilasyonunu sağladığı, böylece endotelial disfonksiyonu düzelttiği gösterilmiştir (Matsubara ve ark., 2012). Çiçek ve ark. (2014), hiperglisemi nedeniyle gözlenen vasküler hasara karşı sitagliptinin koruyucu etkileri olduğunu, ayrıca akut sitagliptin uygulamasının baskılanan aortik gevşeme yanıtlarını reseptör aracılı NO yolağı üzerinden düzelttiğini göstermiştir (Cicek ve ark., 2014).

Yapılan çalışmalarda endotel hücrelerinde yüksek oranda DPP4 bulunduğu tespit edilmiştir (Drucker ve Nauck, 2006; McIntosh, 2008; Moritoh ve ark., 2008). Obezite ve diyabet gibi patolojilerde DPP4'ün aşırı üretiminin endotel fonksiyon hasarını tetikleyebileceği düşünülmektedir. Nitekim, Sanchez-Ferrer ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada çözünür formdaki DPP4'ün (sDPP4) direkt olarak endotel aracılı asetilkolin (ACh) gevşeme yanıtlarında doz bağımlı hasar oluşturduğunu göstermiştir (Sanchez-Ferrer ve ark., 2013). Bu bilgiler ışığında endotel hasarının önlenmesi veya tedavisi amacıyla DPP4 inhibitörlerinin kullanılması mantıklı bir yaklaşım olarak görünmektedir.

### 1.3. $\beta$ Adrenerjik Reseptörler

Adrenerjik reseptörler, Ahlquist tarafından alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) adreseptörler (AR) olarak sınıflandırılmıştır. Bunu takiben 1967 yılında Lands ve ark. beta adreseptörleri  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  olmak üzere alt tiplere ayırmıştır (Arch ve Kaumann, 1993). Bu ayırmadan sonra yapılan çalışmalarda  $\beta_1$ -AR ve  $\beta_2$ -AR aminoasit dizilimlerinin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir (Arch ve Kaumann, 1993).

Kardiyovasküler sistemde beta adrenerjik reseptörler önemli rol oynamaktadır. Kalpte baskın olan  $\beta_1$ -AR'ler kalp atım hızını (pozitif kronotropi) ve kalp kasılma gücünü (pozitif inotropi) arttırmakta, aynı zamanda gevşeme oranında da artışa

(pozitif lusitropi) neden olmaktadır (Queen ve Ferro, 2006). Vasküler düz kas hücrelerinde ve plateletlerde bulunan  $\beta_2$ -AR'ler ise sırasıyla vazodilatasyona ve platelet agregasyonunun inhibisyonuna aracılık etmektedir (Queen ve Ferro, 2006). Ayrıca vasküler endotelial hücrelerde ve daha az olmak üzere myokardiyumda da  $\beta_2$ -AR'ler bulunmaktadır.

G protein kenetli reseptör ailesinden olan  $\beta$  adrenoseptörlerin klasik sinyal yolağı vasküler düz kas hücrelerinde tanımlanan Gs proteini, adenilil siklaz (AC), siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve protein kinaz A'yı kapsamaktadır. Buna ek olarak, mitojen aktive edici protein kinaz (MEK), p42/p44 mitojen aktive edici protein kinaz (p42/p44 MAPK ya da ERK1/2 yolağı), Gi protein kenetli fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3)/ protein kinaz B (Akt) sinyal yolları ile de uyarılabilmektedir (Queen ve Ferro, 2006).

Klasik sinyal yolağında  $\beta$ -AR uyarılmasıyla Gs proteininin  $\alpha$  ünitesi AC ile birleşerek ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü sağlamaktadır. cAMP'nin aktive ettiği PKA çeşitli proteinleri fosforillemektedir. Örneğin vasküler düz kas hücrelerinde PKA, myozin hafif zincir kinazı fosforilleyerek bu proteinin kalmoduline olan affinitesini azaltmakta ve  $\beta_2$ -AR aracılı vazodilatasyon gerçekleştirmektedir. Kardiyak myositlerde ise aktive olan PKA, L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarını uyararak hücre içine  $Ca^{2+}$  girişini arttırmakta ve  $\beta_1$ -AR/ $\beta_2$ -AR aracılı kardiyak kasılmaya yol açmaktadır (Queen ve Ferro, 2006).

İlk literatür bilgileri katekolaminlerin beta adrenoseptör aracılı etkilerini klasik  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  adrenoseptörlerin (AR) aktivasyonu ile ilişkilendirmişse de, beyaz ve kahverengi yağ dokusu, sindirim kanalı gibi dokularda lipoliz, yağ dokularının oksijen tüketimi, sindirim sistemi düz kaslarının gevşemesi gibi yanıtların bu reseptörlerle bağlantılı olmadığı bulunmuştur. Böylece, olası  $\beta_3$  adrenerjik reseptörlerin varlığı hipotezi ortaya atılmıştır (Arch ve Kaumann, 1993; Berlan ve ark., 1995).  $\beta_3$ -AR aracılı etkiler; yağ hücrelerinde oksijen tüketiminin artışı,

lipolizin uyarılması, adenilat siklazın aktivasyonu, cAMP birikmesi gibi metabolik yanıtların farmakolojik analizi temeli üzerinden değerlendirilmiştir (Berlan ve ark., 1995).

### 1.3.1. $\beta_3$ Adrenerjik Reseptörler

Yapılan çalışmalar sonucunda klasik  $\beta$ -AR antagonistlerine düşük affinitesi olan ve yeni atipik  $\beta$ -AR agonistleriyle (BRL37344) selektif olarak uyarılan adreseptörler  $\beta_3$ -AR'ler olarak kabul edilmiştir (Arch ve Kaumann, 1993). İnsan, fare ve sıçanlardan klonlanan  $\beta_3$ -AR'lerin tümü bahsedilen özelliklere sahiptir.

$\beta_3$ -AR'lerin sıçan, fare, hamster, köpek ve tavşan beyaz ve kahverengi adipositlerinde, guinea pig ileumunda ve sıçan gastrik fundusunda yerleştiği bulunmuştur (Arch ve Kaumann, 1993).  $\beta_3$ -AR'lerin adipositler, ileum, distal kolon gibi dokularda yerleştiği gösterildikten sonra diğer dokulardaki varlığı üzerine çalışmalar yapılmıştır. Sooch ve Marshall (1997), sıçanlarda aorta, pulmoner ve mezenterik arterlerle yaptıkları çalışma sonucunda bu damarlarda  $\beta_3$ -AR'lerin bulunduğunu ve bu adreseptörlerin gevşeme yanıtlarına aracılık ettiğini göstermiştir. Klasik  $\beta_1$ -AR ve  $\beta_2$ -AR'lerin yanı sıra üçüncü alttip olan  $\beta_3$ -AR'lerin kalp dokusunda da bulunduğu ve negatif inotropik etkiye aracılık ettiği bulunmuştur (Moens ve ark., 2010). Sonraki dönemde,  $\beta_3$ -AR'ler ile yapılan çalışmalar artmış, bu reseptörlerin yağ hücreleri, gastrointestinal kanal, kalp, vasküler sistem dışında safra kesesi, beyin, prostat, idrar torbası detrüörü ve myometrium çevresinde de bulunduğu bildirilmiştir (Gauthier ve ark., 2011).

Sıçan ve köpek yağ hücreleriyle yapılan çalışmalarda  $\beta_3$ -AR'leri uyarmak için gereken katekolamin konsantrasyonunun  $\beta_1$ -AR ve  $\beta_2$ -AR'leri uyarmak için gerekenden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Berlan ve ark., 1995).  $\beta_3$ -AR'lerin uyarılmak için yüksek katekolamin konsantrasyonuna ihtiyaç duyması, bu

reseptörlerin katekolaminerjik tonusun arttığı olağanüstü stres durumlarında etki gösterebileceğini düşündürmüştür (Berlan ve ark., 1995; Gauthier ve ark., 2011).

### 1.3.2. Kardiyak Sistemde $\beta_3$ Adrenoseptörlerin Rolü

Beta adrenerjik sistem, kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Günümüzde kardiyovasküler sistemde 3 tip beta adrenoseptörün ( $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR,  $\beta_3$ -AR) var olduğu ve bu reseptörlerin kardiyovasküler fonksiyonları düzenlediği kabul edilmektedir (Gauthier ve ark., 2011).

Kalpde bulunan  $\beta_3$ -AR'lerin elektrofizyolojik etkileri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Gauthier ve ark. (2011), tavşan kardiyomyositlerinde uyarılan  $\beta_3$ -AR'lerin NO yolağını aktive ederek  $Ca^{2+}$  transiyentini ve L tipi  $Ca^{2+}$  akışını azaltıp  $K^+$  akışını ( $I_{Ks}$ ) arttırdığını gözlemlemiştir. Öte yandan insan atriumunda  $\beta_3$ -AR'lerin uyarılması düşük sıcaklıklarda L tipi  $Ca^{2+}$  kanallarından  $Ca^{2+}$  akışını artırarak kasılma yanıtına aracılık ederken, fizyolojik sıcaklıklarda bu akışa etki etmemektedir (Gauthier ve ark., 2011). Ventriküllerde  $\beta_3$ -AR'lerin uyarılmasının negatif inotropik etkili olduğu,  $\beta_3$ -AR agonistleriyle gözlenen konsantrasyon bağımlı negatif inotropik etkinin  $Ca^{2+}$  transiyenti ve L tipi  $Ca^{2+}$  akışındaki azalmayla ilişkili olduğu, bu yanıtın  $G_{i/o}$  proteini ve NO yolağının aktivasyonu sonucu oluştuğu bildirilmiştir (Audigane ve ark., 2009; Gauthier ve ark., 2011). Sonuç olarak transplant insan kalplerinde yapılan çalışmalarda  $\beta_3$ -AR'lerin atrium ve ventriküllerde farklı yanıtlara aracılık ettiği gözlenmiştir (Gauthier ve ark., 2011).

### 1.3.3. Vasküler Sistemde $\beta_3$ Adrenoseptörlerin Rolü

Sıçan torasik aortasında yapılan çalışmalar endotel hücrelerinde  $\beta_3$ -AR'lerin varlığını ortaya koymuştur. Trochu ve ark. (1999) sıçan torasik aortasında  $\beta_3$ -AR agonisti olan SR58611 ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları gözlemlemiştir. Bu gevşeme yanıtı nadolol varlığında değişmemiş,  $\beta_3$ -AR antagonisti olan SR59230A varlığında ise ortadan kalkmıştır. Bu veriler ışığında sıçan torasik aortasında gözlenen gevşeme yanıtının  $\beta_1$ -AR ya da  $\beta_2$ -AR aracılı değil,  $\beta_3$ -AR üzerinden gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (Trochu ve ark., 1999). Aynı çalışmada, endotel tabakası tahrip edildiğinde gözlenen gevşeme yanıtının ortadan kalkması,  $\beta_3$ -AR'lerin endotelyumda lokalize olduğunu vurgulamaktadır (Trochu ve ark., 1999).

$\beta_3$ -AR'lerin uyarılması endotelial NO sentaz (eNOS) aktivasyonu sonucu damarda gevşeme yanıtına aracılık etmektedir (Rautureau ve ark., 2002; Trochu ve ark., 1999). Ignarro ve ark. (2002), nebivolol ile yaptıkları çalışmada gevşeme yanıtının köpek pulmoner arter halkalarında endotel aracılığıyla, sıçan aorta halkalarında hem endotel aracılı hem de endotelden bağımsız olarak gerçekleştiğini göstermiştir. Endotel aracılı gevşeme yanıtlarının NO/cGMP sinyal yolağı üzerinden, endotelden bağımsız olan yanıtın ise alternatif bir yolak üzerinden olduğu öne sürülmüştür (Ignarro ve ark., 2002). Benzer olarak Flacco ve ark. (2013), sıçan aortasında yaptıkları çalışmada endotel hücrelerinde  $\beta_3$ -AR'lerin varlığını göstermiş ve endotel tabakası çıkarılmış aorta halkalarında  $\beta_3$ -AR aracılı vazodilatasyonun ortadan kalktığını bulmuştur. Ayrıca aortada gözlenen  $\beta_3$ -AR aracılı vazodilatasyon yanıtının NO/cGMP sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir (Flacco ve ark., 2013).

### 1.4. Amaç

Diyabet ve metabolik sendrom gibi patolojilerde vasküler endotel fonksiyonunun bozulduğu gösterilmiştir (Bonetti ve ark., 2003; Verma ve Anderson,

2002). Bu bozukluk ise diyabetik vasküler hastalıkların gelişmesinde kilit rol oynamaktadır (Zeydanli ve ark., 2010). Özellikle diyabetik bireylerde endotel disfonksiyonu gelişmesi endotel aracılı gevşeme yanıtlarının azalmasını tetiklemektedir. Günümüzde kullanılan DPP4 inhibitörlerinin anti-diyabetik etkinliklerine ek olarak damar gevşeme yanıtlarını da arttırdığı, böylece vasküler sistem üzerinde koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Öte yandan, damar endotel hücrelerinde fonksiyonel  $\beta$ 3-AR'lerin varlığı ve eNOS aracılı vazodilatör etkileri bulunmuştur. Bu bilgilerden yola çıkarak, yüksek lisans tezi kapsamında diyabete bağlı olarak gelişen vasküler hasarın önlenmesinde bir dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) inhibitörü olan sitagliptinin olası etkinliğinin metabolik etkisinden bağımsız olarak, diyabetik sıçan aortasındaki beta 3 adrenoseptör ( $\beta$ 3-AR) aracılı gevşeme yanıtları üzerinden araştırılması amaçlanmıştır.

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. Kullanılan Gereçler**

#### **2.1.1. Malzemeler**

- Kan şekeri ölçüm cihazı (Contour Plus, Bayer)
- Kan şekeri ölçüm stripleri (Contour Plus, Bayer)
- Su banyosu (MAY, Commat Ltd. Ankara, TÜRKİYE)
- General transducer amplifier (MAY, Commat Ltd. Ankara, TÜRKİYE)
- İzole organ banyosu sistemi (MAY, Commat Ltd. Ankara, TÜRKİYE)
- Veri kayıt ve analiz sistemi (MP30 Data Acquisition System, Biopac-System Inc, Santa Barbara-California, ABD)
- %95 Oksijen, %5 karbondioksit içeren gaz karışım tüpü
- Santrifüj (Hettich, EBA 12, Tuttlingen, ALMANYA)
- Santrifüj (Hettich Rotina 35R , Tuttlingen; ALMANYA)
- Otoklav (ALP, Japonya)
- İnkübatör (PH050A, ART Labortechnik)
- Kaba terazi (Scaltec, SBA 61 Heiligenstadt, ALMANYA)
- Hassas terazi (KERN ABJ)
- Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler (Eppendorf, Hamburg, ALMANYA)
- Vorteks (Scilogex, ABD)

- Pipet uçları (Standart ve RNase free özellikte)
- pH metre (ISOLAB)
- Hızlı santrifüj (HERMLE, ALMANYA)
- -80<sup>0</sup>C Derin dondurucu (NÜVE)
- 4<sup>0</sup>C Buzdolabı (Arçelik)
- Likit nitrojen tankı
- Buz makinası (Hosizaki Ice Maker, JAPONYA)
- Çeşitli cam ve plastik malzemeler (Standart ve DNase Free özellikte)
- Cerrahi makas ve pensler
- Elektroforez aleti (Bio-Rad, ABD)
- Güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)
- Röntgen filmi (Retina X-Ray)
- Manyetik karıştırıcı (İsolab)
- 3 boyutlu çalkalayıcı (Yellow Line)
- İmage J analiz programı (versiyon 1.46, ABD)
- Histolojik kesit alma aleti (Microm HM 325, Almanya)
- Işık mikroskobu (Leica DMRB, Almanya)
- Doku takip sistemi (Shandon citadel, Almanya)

### 2.1.2. Kimyasal Maddeler

- Sıçan Yemi (Purina, Gebze,Türkiye)
- Streptozotosin (Sigma Chemical Co, ABD)
- Sitagliptin (JANUVIA 100 mg/28 film tablet, Merck Sharp & Dohme)
- Sodyum sitrat (Sigma Chemical Co, ABD)
- HCl (Sigma Chemical Co, ABD)
- Eter (Sigma Chemical Co, ABD)
- NaCl (Merck Co, ABD)
- KCl (Sigma Chemical Co, ABD)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Chemical Co, ABD)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Chemical Co, ABD)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma Chemical Co, ABD)
- $\text{NaHCO}_3$  (Sigma Chemical Co, ABD)
- $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Sigma Chemical Co, ABD)
- L-Fenilefrin (Sigma Chemical Co, ABD)
- Asetilkolin (Sigma Chemical Co, ABD)
- İzoprenalin (Sigma Chemical Co, ABD)
- CL 316,243 (Sigma Chemical Co, ABD)
- L-NAME (Sigma Chemical Co, ABD)

- Gliserol (Fluka)
- %7,5 TGX Fast Cast Akrilamid Jel Kiti (Bio-Rad, ABD)
- SDS (Bio-Rad, ABD)
- TEMED (Bio-Rad, ABD)
- PVDF membran (Bio-Rad, ABD)
- Tris baz (Merck)
- Glisin (Bio-Rad, ABD)
- Metanol (Sigma 24229)
- Protein belirteci (Neb)
- Anti- $\beta_3$ -AR antikoru (abcam, ab59685)
- Anti-eNOS antikoru (cell signaling technology, 9572S)
- Anti-peNOS antikoru (cell signaling technology, 9571S)
- Anti-tavuk sekonder antikor (anaspec, 29710)
- Anti-tavşan sekonder antikor (cell signaling technology, 7074)
- BSA (Sigma, A7030)
- TBS (Bio-Rad)
- Tween 20
- ECL kiti (Thermo, ABD)
- Hematoksilen ve eozin boyası (Merck, Almanya)

- immunoperoksidaz streptavidin/biotin immunoperoxidaz kiti (Thermo Fischer, ABD)
- Protein bloke edici serum (Thermo, ABD)
- Aminoetil karbasol kromojeni (Thermo, ABD)

### **2.1.3. Deney Hayvanları**

Bu çalışmada Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezinden sağlanan 200-250 g ağırlığında 8 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma süresince sıçanlar her kafeste dörder sıçan olacak şekilde toplu kafeslerde tutulmuş, sıcaklığı ( $22\pm1^{\circ}\text{C}$ ) ve ışıklandırılması (07.00-19.00 saatleri arası aydınlık, 19.00-07.00 saatleri arası karanlık) kontrol altında tutulan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinde barındırılmıştır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan izin alınmıştır.

## **2.2. Kullanılan Yöntemler**

### **2.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması**

Çalışmamızda kontrol (K), diyabetik (D) ve sitagliptin tedavili diyabetik (S) olmak üzere üç farklı deney grubu oluşturulmuştur. Diyabet oluşturulduktan sonra kardiyovasküler komplikasyonların gelişmesi için 10 hafta beklenmiştir. Bu süre sonunda sitagliptin tedavisine başlanmıştır. Sitagliptin tedavisi 10 mg/kg/gün olarak 4 hafta boyunca oral olarak yapılmıştır, bunun için 1 tablet (100 mg sitagliptin ihtiva eder) havanda ezilerek distile su içinde süspansiyon haline getirilmiştir. Tedavi

yapılmayan sıçanlara oral olarak yalnızca distile su verilmiştir. Sıçanların beden ağırlıkları ve kan şekerleri haftalık olarak izlenmiştir.

14 haftalık deney süresi sonunda, sıçan aortaları izole edilerek  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtları incelenmiş, ayrıca sıçan aorta dokularının bir kısmı likit nitrojende dondurularak western blot deneyleri için -80 °C’de saklanmıştır.

### **2.2.2. DeneySEL Diyabetin Oluşturulması**

Diyabet tek doz intraperitoneal (i.p) streptozotosin (STZ, 35 mg/kg) uygulaması ile oluşturulmuştur. Bunun için pH: 4,5 olan 0,1 M sitrat tamponu içinde hazırlanan STZ çözeltisi kullanılmıştır. STZ uygulamasını takiben 72 saat sonra kuyruktan kan alınarak glukoz stikleri yardımıyla kan şekeri ölçülmüş, kan şekeri 250 mg/dl’nin altında olan sıçanlar deneye dahil edilmemiştir.

*Sitrat tamponu hazırlanması:*

2,94 g Na sitrat tartılarak distile su içinde çözülmüş ve hacmi 100 ml’ye tamamlanmıştır. 1N HCl ile pH’sı 4,5’a ayarlanmış ve +4°C’de saklanmıştır.

### **2.2.3. İzole Organ Banyosu Deneyleri**

#### **2.2.3.1. Torasik Aorta Halkalarının (Ringlerinin) Hazırlanması**

Sıçanlar eter ile anestezi altındayken göğüs kafesi açılarak aorta çıkarılıp soğuk Krebs çözeltisi (120 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,25 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,25 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  ve 10 mM glukoz monohidrat) içine alınmıştır. Yağ ve bağ dokusundan temizlenen aortalar 3-5 mm’lik halkalara ayrılmıştır. Krebs çözeltisi içeren dikey organ banyosuna asılan aorta halkalarına, 2

g'lık gerim uygulanmıştır. %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> içeren gaz karbojen karışımı ile sürekli havalandırılan ve sıcaklığı 36 °C'de sabitlenen banyolarda asılı olan halkalar, 15 dakikada bir yıkanarak 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda halkalar 10<sup>-5</sup> M fenilefrin ile kastırılmış, kasılma platoya ulaştıktan sonra 10<sup>-5</sup> M asetilkolin ile gevşetilerek endotel tabakasının sağlam (intakt) olup olmadığı kontrol edilmiştir.

#### **2.2.3.2. Torasik Aorta Halkalarında Kasılma-Gevşeme Yanıtlarının Ölçülmesi**

Endotel tabakasının sağlam olduğu anlaşılan aorta halkalarında  $\alpha$ -AR aracılı kasılma yanıtını ölçmek üzere  $\alpha_1$ -AR agonisti fenilefrin (10<sup>-8</sup>-10<sup>-5</sup> M) kullanılarak konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır. Elde edilen değerler ışığında her bir damar için submaksimal (maksimum yanıtın %70'i) kasılma dozu hesaplanmıştır.

Bazal seviyeye inen damarlar submaksimal fenilefrin dozu ile kastırıldıktan sonra  $\beta$ -AR aracılı gevşeme yanıtları değerlendirilmek üzere selektif olmayan  $\beta$ -AR agonisti izoprenalinin (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M) konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır.

Bazal seviyeye inen damarlar submaksimal fenilefrin dozu ile kastırıldıktan sonra  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtları değerlendirilmek üzere selektif  $\beta_3$ -AR agonisti CL 316,243 (10<sup>-11</sup>-10<sup>-6</sup> M) ile konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır.

CL 316,243 ile gözlenen gevşeme yanıtının NOS aracılı olup olmadığını belirlemek üzere, bu agonist ile elde edilen gevşeme yanıt eğrileri eNOS inhibitörü L-NAME (10<sup>-4</sup> M, 30 dakika inkübasyon) varlığında tekrarlanmıştır.

#### 2.2.4. Western Blot Deneyleri

-80°C’de saklanan aorta halkaları likit nitrojen ile toz edilip RIPA çözeltisi ile ultrasonik homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Protein konsantrasyonu BCA (bikinkoninik asit) yöntemiyle ölçülmüştür. 6X Laemli çözeltisi ile 30 dakika 37°C’de denatüre edilen protein örnekleri jele yüklenmek üzere -20°C’de saklanmıştır.

%7,5 TGX Fast Cast Akrilamid Kiti ile hazırlanan jeller, elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine 1X TGS çözeltisi eklenmiş ve her bir kuyuya 60 µg numune yüklenmiştir. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak 50 Voltta 15 dk, sonrasında ise 120 Voltta 80 dk olacak şekilde elektroforez işlemi uygulanmıştır.

Ayrılan numuneler çizelge 2.1’de belirtilen formül ile hazırlanan transfer çözeltisi içinde PVDF membrana 100 Voltta 4 saatlik sürede transfer edilmiştir. Daha sonra membranlar 5 dk TBST çözeltisi ile yıkanmış, ardından %5 BSA TBST çözeltisi ile 1 saat süreyle bloklanmıştır. Blok çözeltisinden alınan membranlar 10’ar dakikada bir çözelti değiştirilmek suretiyle 3 kere TBST çözeltisi ile yıkanmıştır.

**Çizelge 2.1.** Transfer Çözeltisi Hazırlama Formülü

|              |        |
|--------------|--------|
| Tris baz     | 2,32 g |
| Glisin       | 11,6 g |
| Metanol      | 160 ml |
| Bidistile su | 640 ml |

Sonrasında membranlar primer antikor ile bir gece boyunca +4°C’de muamele edilmiştir.  $\beta_3$ -AR, total-eNOS ve fosforile-eNOS protein düzeylerine bakmak için primer antikor olarak sırasıyla anti- $\beta_3$  (1:250), anti-eNOS (1:500) ve anti-fosfo-eNOS (ser1177) (1:1000) ve anti-  $\alpha$  tubulin (1:5000) antikorları kullanılmıştır.

Ertesi sabah primer antikordan alınan membranlar 10'ar dakikada bir çözelti değiştirilmek suretiyle 3 kere TBST çözeltisi ile yıkanmıştır. Sonrasında sekonder antikor ile 90 dakika süreyle muamele edilen membranlara kemiluminesans özellikli HRP substratı (ECL, Biorad) uygulanmış, ve membranlardaki sinyal görüntüleri röntgen filmine aktarılmıştır. Sekonder antikor olarak her bir protein için sırasıyla anti-tavuk antikor (1:3000), anti-tavşan antikor (1:1000), anti-tavşan antikor (1:1000) ve anti-tavşan antikor (1:2000) kullanılmıştır.

Protein bantları ImageJ programı yardımıyla analiz edilmiş, elde edilen değerler kontrol (housekeeping) gen olan  $\alpha$ -tubulin ile elde edilen değerlere oranlanarak örneklerle ait protein ekspresyon düzeyleri hesaplanmıştır.

### **2.2.5. Histopatoloji ve İmmunohistokimya Deneyleri**

Çalışmamızda aorta duvarında diyabet ile görülen endotelial disfonksiyona bağlı hasar olup olmadığını değerlendirmek ve  $\beta_3$ -AR, total-eNOS proteinlerinin fizyolojik ve patolojik durumlarda aortadaki lokalizasyonunu belirlemek amacıyla histopatoloji ve immunohistokimya deneyleri yapılmıştır.

Histopatolojik analizler için aorta dokuları %10'luk tamponlu formol solüsyonu içinde en az 24 saat tespit edilmiştir. Tespit olan aortalar rutin patoloji doku takip sistemi ile takip edilmiştir. Kısaca, dokular formol solüsyonu içinden çıkarılarak akar çeşme suyunda 6 saat boyunca yıkandıktan sonra sırasıyla %50, %70, %96 ve absöü alkol serilerinde 2 saat süreyle tutulmuş, sonrasında 2 saat boyunca Ksilen ile muamele edilen dokular en son parafine getirilerek 2 saat parafinde bekletilip parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklar mikrotom ile 4-5 mikron kalınlığında kesilerek adeziv lam üzerine alınmıştır. Kesitler seri olarak alınıp, her bir hayvana ait aorta dokularının farklı bölgelerinden alınan numuneler saklanmıştır. Kesitler, histopatolojik analizlerin yapılması için rutin Hematoksilen ve eozin boyaması ve mevcut kollajen yapısında artışın olup olmadığının araştırılması

için Masson Trikrom boyaması yapılarak görüntülenmiştir. Aortanın media katmanı Hematoksilen ve eozin boyaması yapılan kesitlerde ışık mikroskobu altında çekilen dijital resimler üzerinde ImageJ yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerler kalibre edilen yazılım ile mikrometre cinsinden istatistiksel analizler için kaydedilmiştir. Masson Trikrom boyama ile fibrozis ya da kollajen artışının olup olmadığı ışık mikroskobu altında çekilen dijital resimlerin aynı yazılım ile yüzde (%) boyanma alanları bulunarak yapılmıştır. Her bir kesitte farklı bölgelerden çekilen en az imaj üzerinde yapılan analizin ortalaması alınarak gruplar arası fark araştırılmıştır.

İmmünohistokimyasal analiz için aorta dokularında eNOS ve  $\beta$ 3-AR antijenlerinin gösterilmesi amacıyla ticari indirekt immunoperoksidaz streptavidin/biotin immunoperoksidaz kiti kullanılmıştır ve tüm uygulamalar kit protokolüne uyularak gerçekleştirilmiştir. Buna göre; kesitler üç ksilol serisinde 5'er dakika deparafinize edilerek absolü alkol, % 96, % 70 ve %50'lik alkol serisi ve distile suda 5'er dakika tutularak rehidre edilmiştir. Dokular metanolde hazırlanmış % 3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika tutularak endojenaz peroksidaz aktivitesi giderilmiştir. Sitrata tamponu (pH:6) ile mikrodalga fırın içinde kontrollü olarak antijen geri alma işlemi gerçekleştirilmiş sonrasında protein bloke edici serumda 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra her bir kesit; eNOS ve  $\beta$ 3-AR ile gece boyunca inkube edilmiştir. Biotinle işaretli sekonder antikorla 25 dakika, streptavidin-peroksidaz enzimi ile 25 dakika tutulduktan sonra renk reaksiyonu için aminoetil karbasol (AEC) kromojeni ile kontrollü olarak 15-20 dakika, karşıt boyama için de Mayer'in hematoxileni ile 1-2 dakika süreyle boyamaları yapıldıktan sonra su bazlı yapıştırıcı ile kapatılmıştır.

#### **2.2.6. İstatistiksel Analiz**

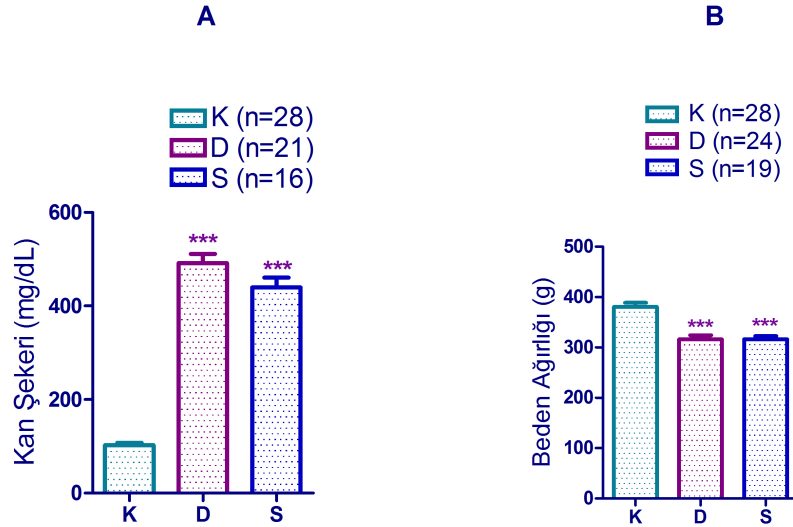
Belli sayıda (n) deney sonucundan elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için One-way ANOVA Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık  $p<0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Sıçanların Genel Özellikleri

Sprague-Dawley sıçanlara uygulanan 35 mg/kg (i.p) STZ injeksiyonundan 72 saat sonra yapılan ölçümlerde kan glukoz düzeyleri 250 mg/dL'nin üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. 14 haftanın sonunda alınan ölüm anı kan örneklerinde yapılan ölçümlerde, diyabetik sıçanların kan glukoz düzeylerinin anlamlı bir biçimde yükseldiği, sitagliptin tedavili grupta ise diyabetik gruba göre anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (K: 102,17±5,76 mg/dL; D: 491,85±19,48 mg/dL; S: 439,75±21,22 mg/dL) (Şekil 3.1A).

Öte yandan, aynı dönem sonunda diyabetik sıçanların beden ağırlıkları kontrollere oranla anlamlı ölçüde düşük kalmıştır. Sitagliptin tedavisinin beden ağırlıkları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmamıştır (K: 380,7±12,8 g; D: 316±8,2 g; S: 316,4±6,3 g) (Şekil 3.1B).

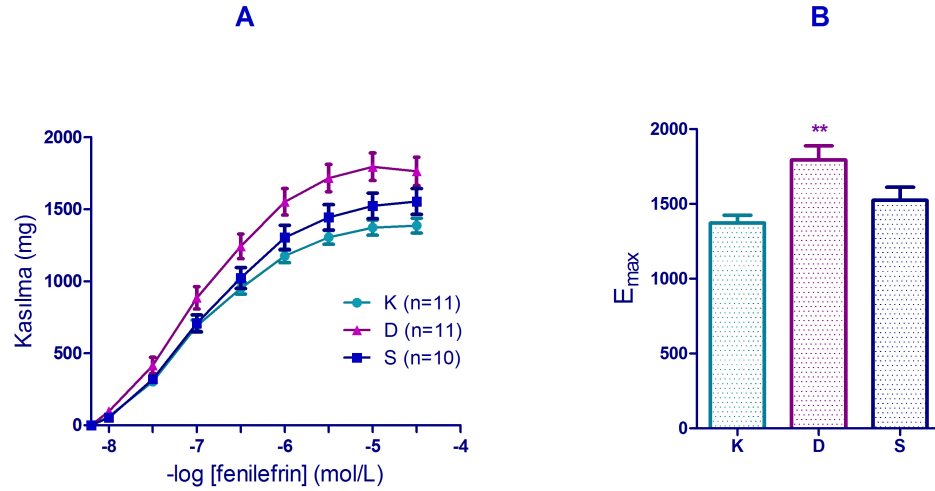


**Şekil 3.1.** Sıçanların genel özellikleri A) Sıçanların 14 hafta sonunda ölüm anı kan şekeri değerleri. B) Sıçanların 14 hafta sonunda ölüm anı beden ağırlıkları. \*\*\* K grubuna göre istatistiksel anlamlılık,  $p < 0,001$ .

### 3.2. İzole Organ Banyosu Deney Sonuçları

#### 3.2.1. Fenilefrin Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri

Sıçanlardan alınan torasik aortalarla yapılan organ banyosu deneylerinde  $\alpha_1$ -AR agonisti olan fenilefrinin  $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M doz aralığındaki damar kasılma yanıtları gözlenmiştir (Şekil 3.2A). Maksimum etki,  $10^{-5}$  M fenilefrin varlığında gözlenmiştir (K:  $1373 \pm 52$  mg; D:  $1795 \pm 95$  mg; S:  $1524 \pm 88$  mg) (Şekil 3.2B). Beklenildiği üzere diyabetik grubun kasılma yanıtları kontrole göre artmıştır. Artan kasılma yanıtları sitagliptin tedavisi ile bir miktar azalsa da, değerler kontrol grubunkine yaklaşmamıştır.

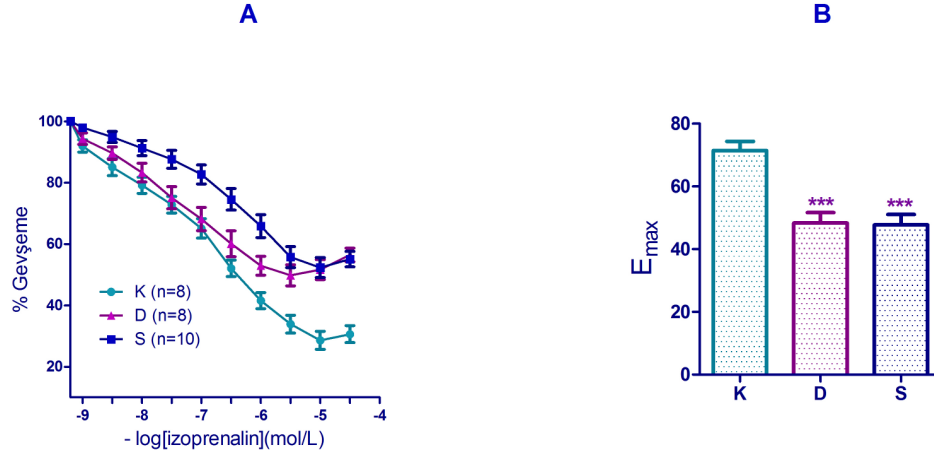


**Şekil 3.2.** Aortada fenilefrin yanıtları A) Fenilefrin konsantrasyon-yanıt eğrisi. B)  $10^{-5}$  M fenilefrin varlığında görülen maksimum etki. \*\* K grubuna göre istatistiksel anlamlılık,  $p < 0,01$ .

#### 3.2.2. İzoprenalalin Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri

Sıçanlardan alınan torasik aortalarla yapılan organ banyosu deneylerinde selektif olmayan  $\beta$ -AR agonisti izoprenalalinin  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M doz aralığındaki damar

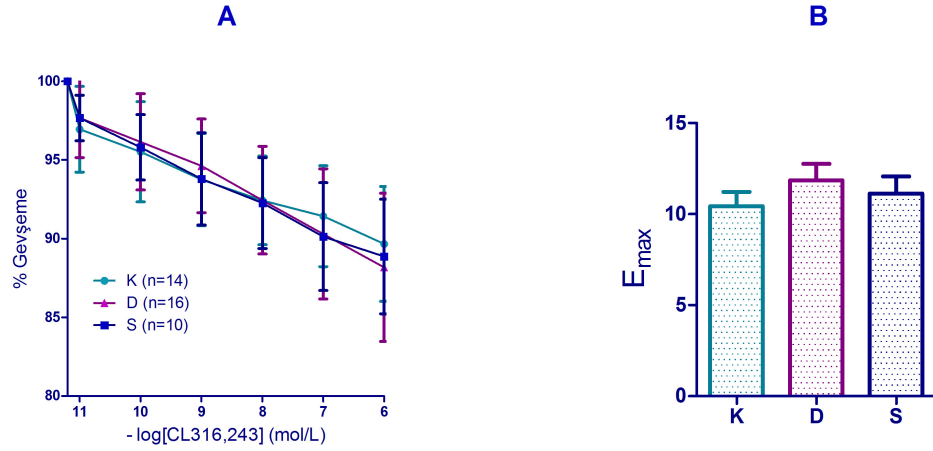
gevşeme yanıtları gözlenmiştir (Şekil 3.3A). Maksimum etki,  $10^{-5}$  M izoprenalin varlığında gözlenmiştir (K:  $71,4 \pm 2,9$ ; D:  $48,5 \pm 3,3$ ; S:  $47,8 \pm 3,2$ ) (Şekil 3.3B). Diyabetik grubun gevşeme yanıtları kontrole göre azalmıştır. Sitagliptin tedavisi, diyabetle azalan gevşeme yanıtları üzerinde anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır.



**Şekil 3.3.** Aortada izoprenalin yanıtları A) İzoprenalin konsantrasyon-yanıt eğrisi. B)  $10^{-5}$  M izoprenalin varlığında görülen maksimum etki. \*\*\* K grubuna göre istatistiksel anlamlılık,  $p < 0,001$ .

### 3.2.3. CL 316,243 Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri

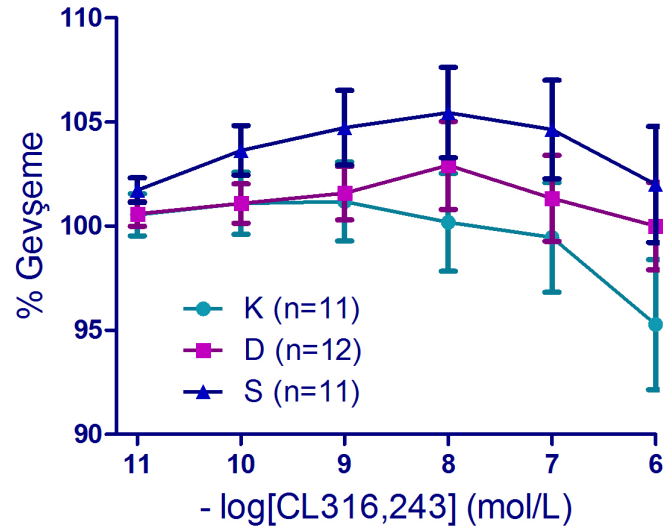
Sıçanlardan alınan torasik aortalarla yapılan organ banyosu deneylerinde  $\beta_3$ -AR agonisti CL 316,243'ün  $10^{-11}$ - $10^{-6}$  M doz aralığındaki damar gevşeme yanıtları gözlenmiştir (Şekil 3.4A). Maksimum etki,  $10^{-6}$  M CL 316,243 varlığında gözlenmiştir (K:  $10,4 \pm 0,8$ ; D:  $11,8 \pm 0,9$ ; S:  $11,1 \pm 0,9$ ) (Şekil 3.4B). Gevşeme yanıtları açısından kontrol, diyabetik, sitagliptin tedavili diyabetik grupların arasında herhangi bir anlamlı fark görülmemiştir.



**Şekil 3.4.** Aortada CL 316,243 yanıtları. A) CL 316,243 konsantrasyon-yanıt eğrisi. B)  $10^{-6}$  M CL 316,243 varlığında görülen maksimum etki.

### 3.2.4. L-NAME Varlığında CL 316,243 Konsantrasyon-Yanıt Eğrileri

CL316,243 ile gözlenen gevşeme yanıtının NOS aracılı olup olmadığını belirlemek üzere sıçanlardan alınan torasik aortalarla yapılan organ banyosu deneyleri eNOS inhibitörü L-NAME ( $10^{-4}$  M, 30 dakika inkübasyon) varlığında tekrarlanmıştır. Bunun için L-NAME ile inkübe edilen banyolarda  $\beta_3$ -AR agonisti CL 316,243'ün  $10^{-11}$ - $10^{-6}$  M doz aralığındaki damar gevşeme yanıtları gözlenmiştir (Şekil 3.5). eNOS inhibitörü varlığında CL316,243 ile gözlenen gevşeme yanıtlarının bozulduğu gözlenmiştir.  $10^{-7}$  M konsantrasyondan sonra gevşeme eğiliminin başladığı ve bu eğilimin esas olarak kontrol grupta belirgin olduğu bulunmuştur.

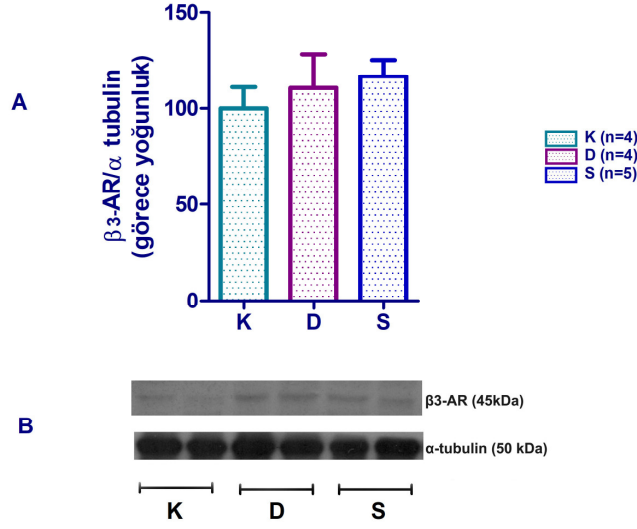


Şekil 3.5. L-NAME varlığında CL 316,243 konsantrasyon-yanıt eğrisi.

### 3.3. $\beta_3$ -AR, eNOS ve Fosforile-eNOS Protein İfadeleri

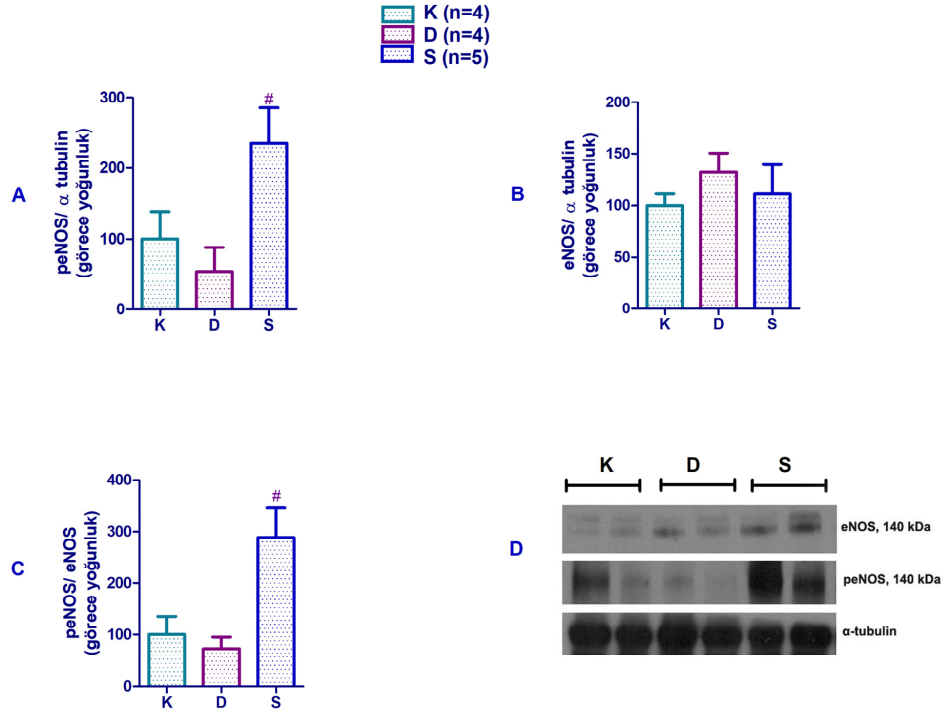
Kontrol, diyabetik ve sitagliptin tedavili diyabetik sıçan aortasında  $\beta_3$ -AR, eNOS ve fosforile-eNOS protein ifadeleri western blot yöntemiyle belirlenmiştir. Okunan band yoğunlukları kontrol (housekeeping) gen olan  $\alpha$ -tubulin band yoğunluklarına oranlanarak ifade edilmiş ve gruplar karşılaştırılmıştır.

$\beta_3$ -AR protein ifadesi kontrol, diyabetik, sitagliptin tedavili diyabetik gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (K:  $100,00 \pm 11,12$ ; D:  $110,74 \pm 20,42$ ; S:  $116,64 \pm 8,79$ ) (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.**  $\beta_3$ -AR protein ifade düzeyleri. A)  $\beta_3$ -AR protein band yoğunluğunun  $\alpha$ -tubulin band yoğunluğuna oranı B) Repezantif band görüntüleri ( $\beta_3$ -AR, 45 kDa;  $\alpha$ -tubulin, 50 kDa).

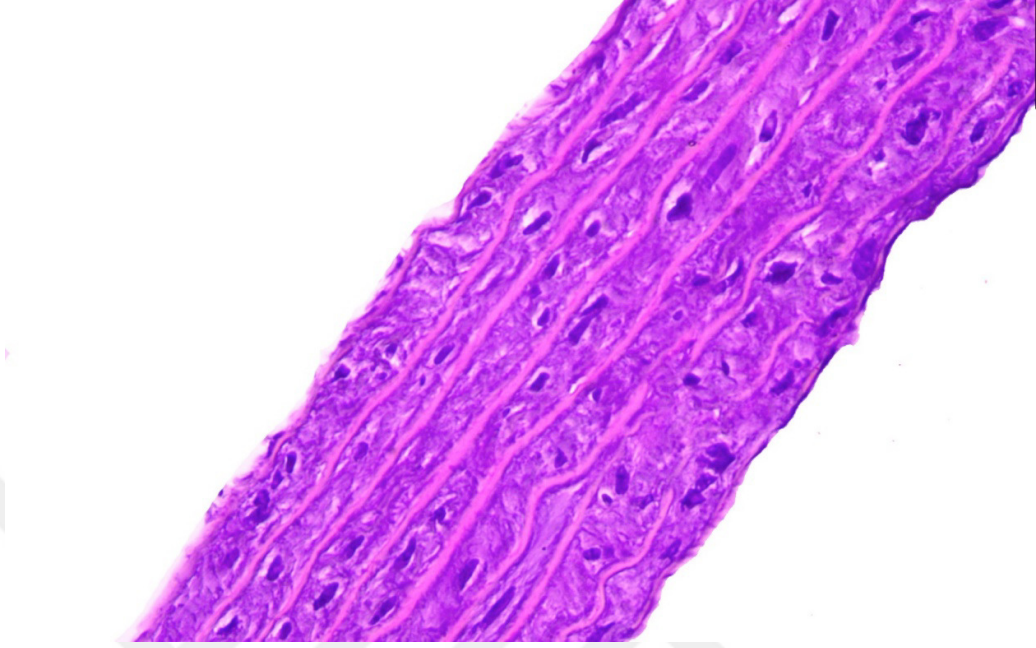
Aortada görülen  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtları eNOS yolağı üzerinden gerçekleştiği için bu yolak üzerindeki değişimleri görmek üzere eNOS ve peNOS protein ifadeleri ölçülmüştür. Sitagliptin tedavili diyabetik grupta peNOS protein ifadeleri, diyabetik gruba göre anlamlı ölçüde artmıştır (K: 100,00±38,66; D: 53,71±34,49; S: 235,09±50,25) (Şekil 3.7A). eNOS protein düzeyleri diyabetik grupta kontrole göre artmış, artan bu protein düzeyleri sitagliptin tedavisi ile kontrole yaklaşmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (K: 100,00±10,84; D: 132,03±18,55; S: 129,36±28,22) (Şekil 3.7B). peNOS/eNOS oranı diyabetik gruba oranla sitagliptin tedavili grupta anlamlı olarak artmıştır (Şekil 3.7C).



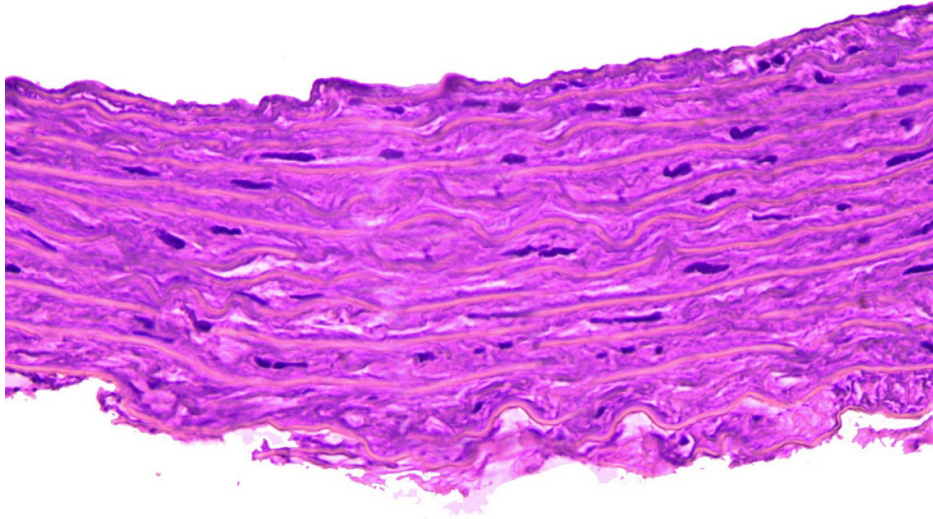
**Şekil 3.7.** eNOS ve peNOS protein ifade düzeyleri A) peNOS protein band yoğunluğunun  $\alpha$ -tubulin band yoğunluğuna oranı. B) eNOS protein band yoğunluğunun  $\alpha$ -tubulin band yoğunluğuna oranı. C) peNOS band yoğunluğunun eNOS band yoğunluğuna oranı. D) Reprezantif band görüntüleri (eNOS, 140 kDa; peNOS, 140 kDa). # Diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılık,  $p<0,05$ .

### 3.4. Histopatolojik Bulgular

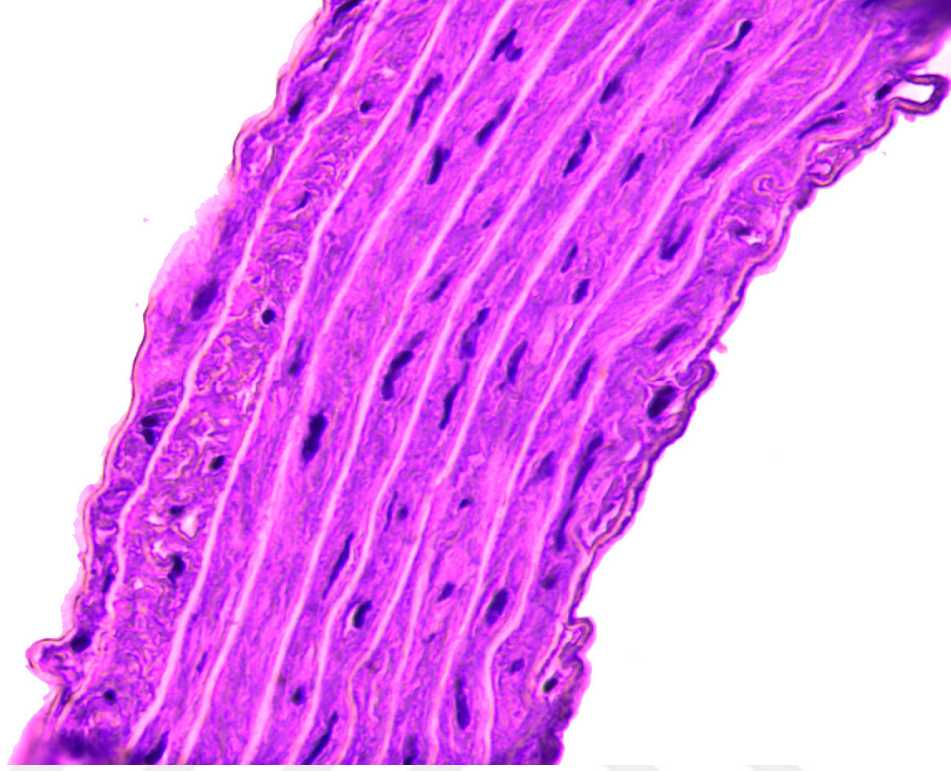
Kontrol grubunda aorta media katmanının  $91,68\pm3,003$  mikrometre kalınlığında olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.8). Diyabetik sıçanlara ait aorta dokularında aortanın media katmanının kontrol grubuna ve tedavi grubuna göre kalınlaştığı dikkati çekmektedir. Bu kalınlaşma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $96,93\pm2,62$ ) (Şekil 3.9). Sitagliptin tedavili grupta yer alan sıçanlara ait aorta media katmanı kalınlığı kontrol ve diyabetik grubundan farklı bulunmuştur ( $94,51\pm3,041$ ) (Şekil 3.10). Media katmanı kalınlığının ortalamaları ve istatistiksel bulguları Şekil 3.11’de gösterilmiştir.



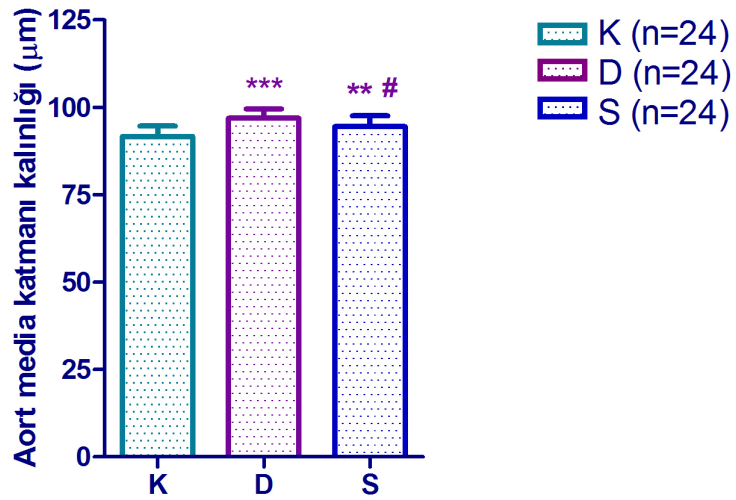
**Şekil 3.8.** Kontrol grubuna ait sıçan aortası kesiti. Histolojik olarak normal görünümde. Hematoksilen ve eozin boyaması. Büyütme 400X.



**Şekil 3.9.** Diyabet grubunda yer alan sıçan aorta kesiti. Aortanın kalınlaştığı ve düz kas hücrelerinin bir örnek olmadığı ve çekirdeklerinin piknotik ve hiperkromatik olduğu gözlenmekte. Hematoksilen ve eozin boyaması. Büyütme 400X.

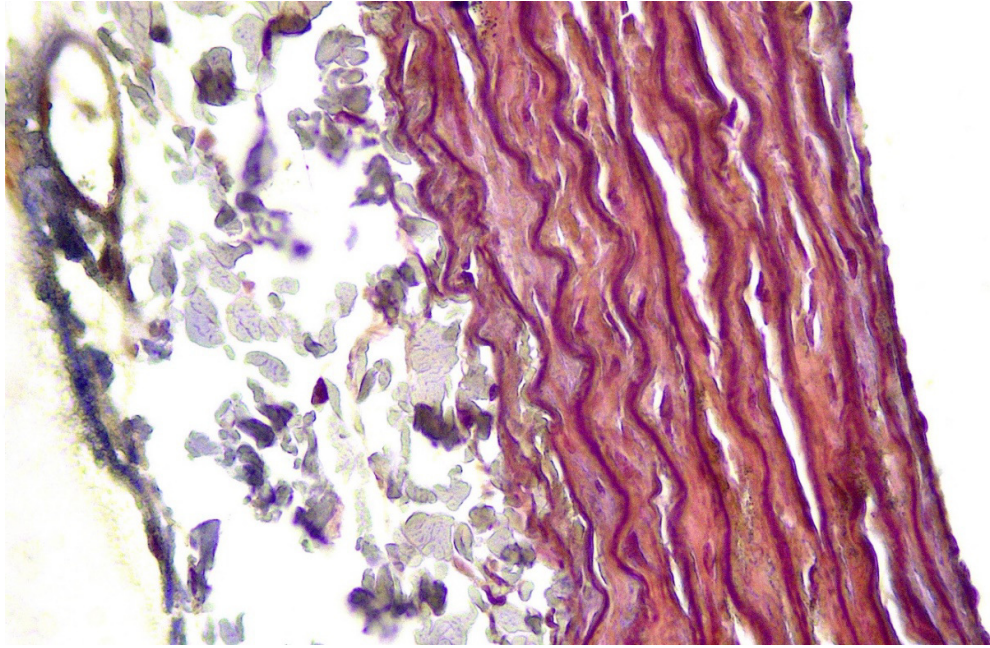


**Şekil 3.10.** Sitagliptin tedavili grupta yer alan sıçan aortası. Düz kas çekirdekleri ve yerleşimleri diyabetik gruba göre daha normal görülmekte. Hematoksilen ve eozin boyaması. Büyütme 400X.

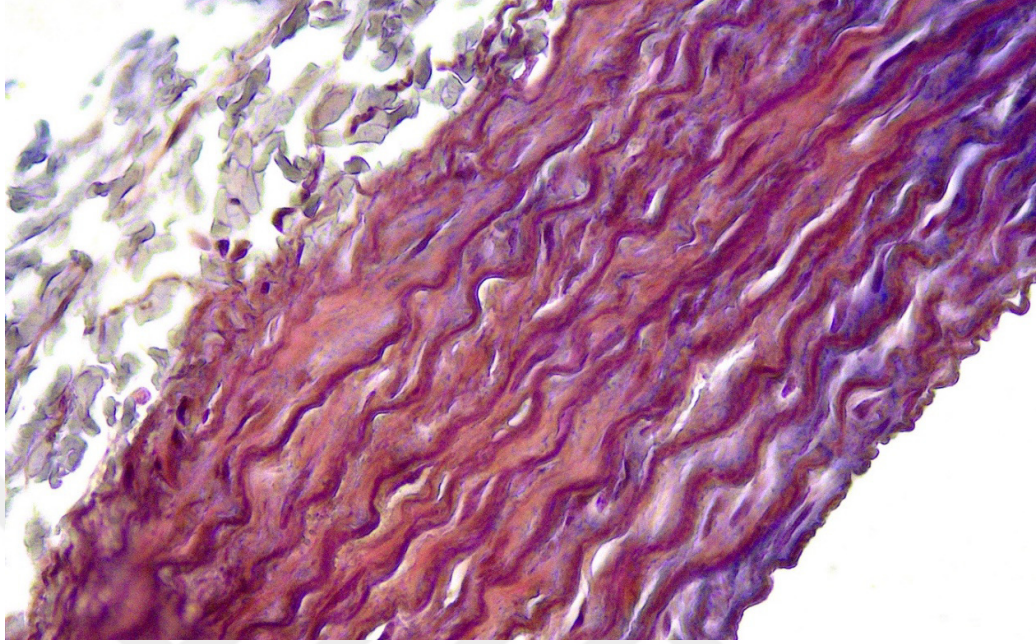


**Şekil 3.11.** Aorta media katmanı kalınlığının karşılaştırması. \*\*Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık, # Diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılık,  $p < 0,001$ .

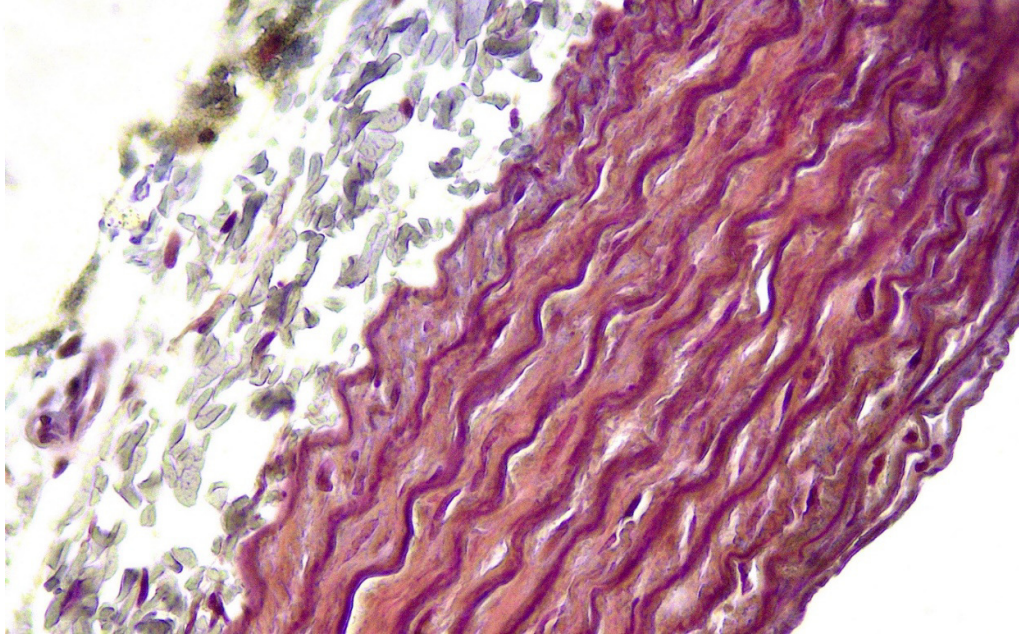
K grubunda yer alan sıçanlara ait aorta dokularında histolojik olarak herhangi bir anormallik gözlenmemiştir ve masson trikrom boyamada normal boyandığı görülmüştür ( $3,8 \pm 0,47$ ) (Şekil 3.12). Aynı şekilde masson trikrom boyama ile elde edilen imajların değerlendirilmesiyle D grubunda kollajen pozitif alanların arttığı gözlenmiştir ( $6,88 \pm 1,07$ ) (Şekil 3.13). Masson trikrom boyama analizinde S grubunun K ve D gruplarından farklı olduğu gözlenmiştir ( $5,31 \pm 0,96$ ) (Şekil 3.14). Masson Trikrom boyama sonuçları Şekil 3.15’te gösterilmiştir.



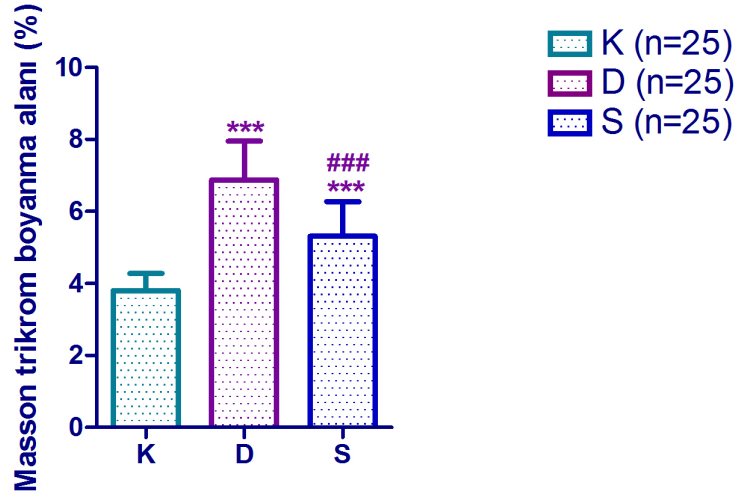
**Şekil 3.12.** Kontrol grubu sıçan aortası. Masson Trikrom boyaması. Büyütme 400X.



**Şekil 3.13.** Diyabetik grupta yer alan sıçan aortası. Mavi boyanan alanlar kollajen pozitif alanları göstermektedir. Masson Trikrom boyaması. Büyütme 400X.



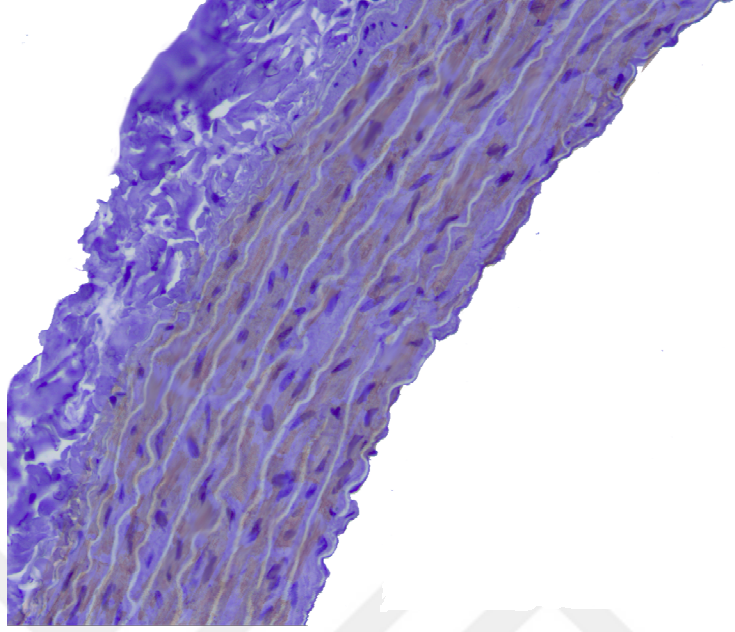
**Şekil 3.14.** Sitagliptin tedavili diyabetik grupta yer alan sıçan aortası. Mavi boyanan alanlar kollajen pozitif alanları göstermektedir. Masson Trikrom boyaması. Büyütme 400X.



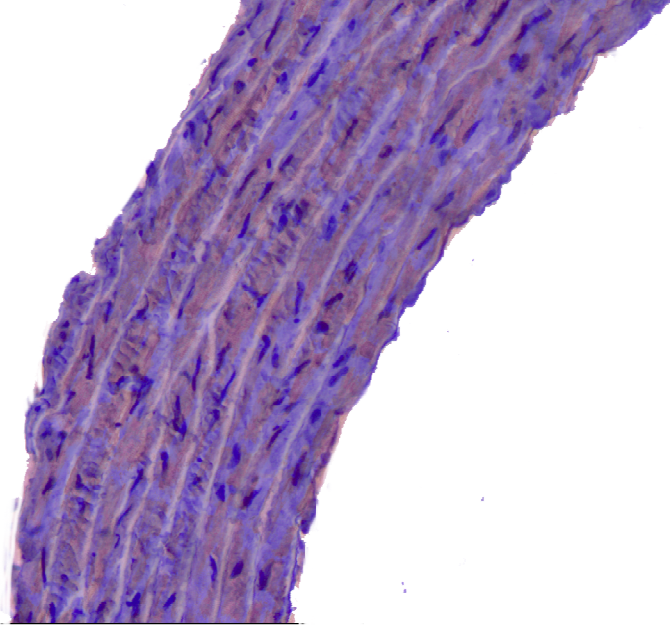
**Şekil 3.15.** Masson trikrom boyama ile elde edilen pozitif boyanma alanlarının karşılaştırması \*Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık, # Diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılık,  $p < 0,001$ .

### 3.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

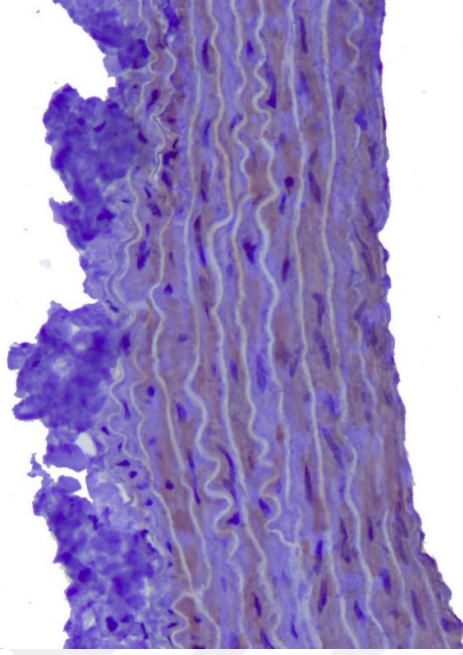
Kontrol, diyabetik ve sitagliptin tedavili diyabetik gruplarındaki sıçanlarda eNOS immünohistokimyasal boyanmaları sırasıyla Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18’de ve istatistiksel analiz sonuçları Şekil 3.19’da gösterilmiştir. K grubunda pozitif boyanma alanı  $8,03 \pm 0,96$ ; D grubunda  $9,36 \pm 0,56$ ; S grubunda ise  $8,16 \pm 0,98$  olarak analiz edilmiştir. Diyabetik grupta kontrol grubuna göre eNOS ifadesinin daha fazla olduğu, bu fazlalığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Sitagliptin tedavili diyabetik grupta eNOS ifadesinin kontrol grubuna göre arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir.



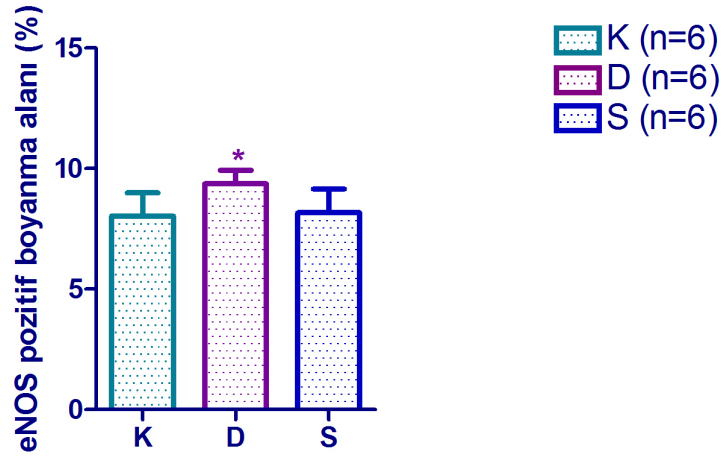
**Şekil 3.16.** Kontrol grubundaki sıçanlara ait aorta kesitinde eNOS boyanması. Boyanma intima dahil tüm katmanlarda diffuz olarak görünmekte. AEC kromojen Hematoksilen arka plan boyaması. Büyütme 100X.



**Şekil 3.17.** Diyabetik gruptaki sıçanlara ait aorta kesitinde eNOS boyanması. Boyanma diffuz ve yoğunluğu daha fazla. AEC kromojen Hematoksilen arka plan boyaması. Büyütme 100X.



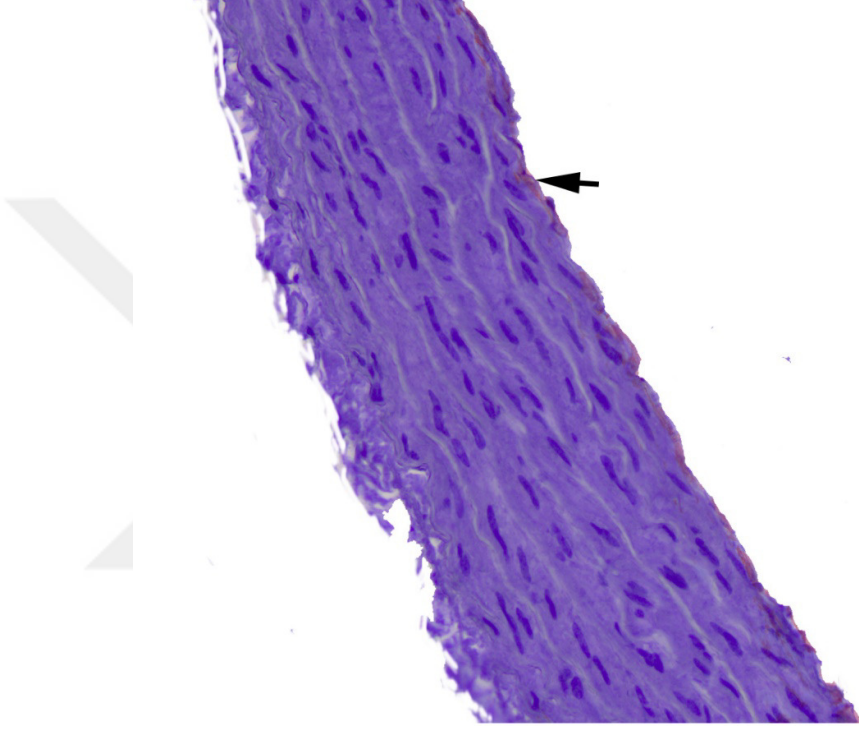
**Şekil 3.18.** Sitagliptin tedavili diyabetik gruptaki sıçanlara ait aorta kesitinde eNOS boyanması. Boyanma tüm katmalarda görülmekte. AEC kromojen Hematoksilen arka plan boyaması. Büyütme 100X.



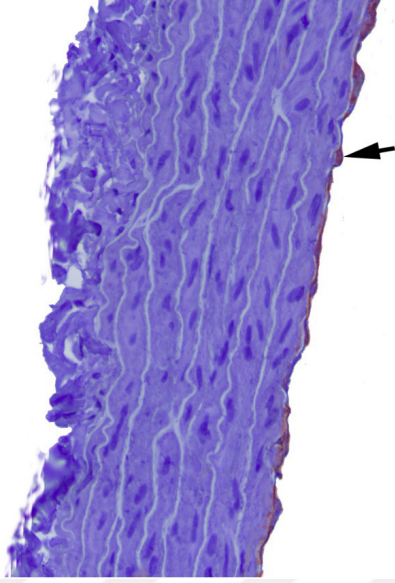
**Şekil 3.19.** Gruplar arası eNOS IHC boyanmasının karşılaştırılması. \*Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık,  $p < 0,05$ .

$\beta_3$ -AR immunohistokimyasal testlerde boyanma aorta endotel tabakasında sınırlı kalmış (Şekil 3.20-3.22) ve tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark

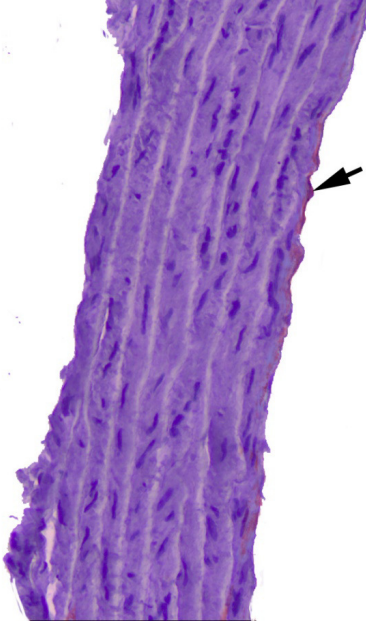
bulunmamıştır (Şekil 3.23). Pozitif boyanma alanları analiz edildiğinde kontrol grubunda  $0,78 \pm 0,08$ ; diyabetik grupta  $0,85 \pm 0,11$ ; sitagliptin tedavili diyabetik grupta ise  $0,84 \pm 0,07$  olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



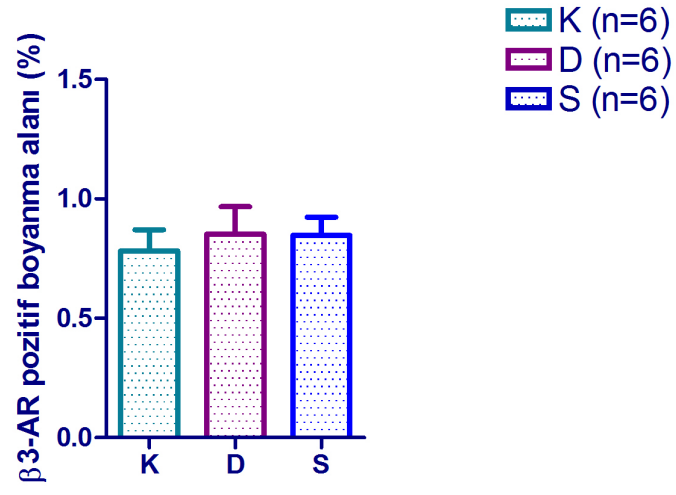
**Şekil 3.20.** Kontrol grubundaki sıçanlara ait aorta kesitinde  $\beta_3$ -AR boyanması. Endotel ile sınırlı boyanma alanları (ok). AEC kromojen Hematoksilen arka plan boyaması. Büyütme 100X.



**Şekil 3.21.** Diyabetik gruptaki sıçanlara ait aorta kesitinde  $\beta_3$ -AR boyanması. Endotel ile sınırlı boyanma alanları (ok). AEC kromojen Hematoksilen arka plan boyaması. Büyütme 100X.



**Şekil 3.22.** Sitagliptin tedavili diyabetik gruptaki sıçanlara ait aorta kesitinde  $\beta_3$ -AR boyanması. Endotel ile sınırlı boyanma alanları (ok). AEC kromojen Hematoksilen arka plan boyaması. Büyütme 100X.



Şekil 3.23. Gruplar arası  $\beta_3$ -AR IHC boyanmasının karşılaştırılması.

#### 4. TARTIŞMA

GLP-1 gibi inkretinlerin yıkımını sağlayan dipeptidil peptidaz 4 enzimini inhibe ederek, glukoz ile uyarılan insulün salınımını artıran DPP4 inhibitörlerinin hipoglisemik etkilerine ek olarak, kardiyovasküler fonksiyonu iyileştirici özelliklerinin de olduğu bildirilmiştir. Araştırmalar, DPP4 inhibitörlerinin anti-inflamatuar, anti-aterosklerotik ve vasküler sistem üzerinde koruyucu etkili olduğunu ortaya koymuştur (Matsubara ve ark., 2012; Shah ve ark., 2011a). DPP4 inhibitörlerinin söz konusu olumlu özelliklerinin GLP-1'e bağımlı mı yoksa GLP-1'den bağımsız mı olduğu ise tartışmalı görünmektedir (Silva Junior ve ark., 2015).

Çalışmamızda 4 haftalık 10 mg/kg/gün sitagliptin tedavisi kan şekeri değerlerini diyabetik gruba göre bir miktar düşürse de, bu azalma istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Bu durum seçilen sitagliptin dozu ile ilişkilendirilebilir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda sitagliptin tedavi dozunun farklılık gösterdiği görülmektedir. Çalışmalarda genellikle 5, 10, 30 ve 50 mg/kg/gün gibi dozlar kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2016; Liu ve ark., 2015; Reimer ve ark., 2012; Vaghasiya ve ark., 2011). Bu doz aralığında kan şekerinde gözlenen azalmaya ilişkin bulgular ise oldukça farklılık göstermektedir. 30 ve 50 mg/kg/gün sitagliptin dozunun kan şekerini anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir. Vaghasiya ve ark. (2011) ise 5 mg/kg/gün doz ile de hipoglisemik etki bildirmiştir. Buna karşın, Lee ve ark. (2016) miyokard infarktüsü oluşturdukları sıçanlara 5 mg/kg/gün sitagliptin tedavisi uygulamış ve bu dozun kan şekerini düşürmeyen bir konsantrasyon olduğu için seçildiğini, böylece, sitagliptinin hipoglisemik etkisinden bağımsız kardiyak olumlu etkilerini araştırdıklarını vurgulamıştır. Benzer şekilde, Reimer ve ark. (2012) 10 mg/kg/gün sitagliptin tedavisi uyguladıkları ZDF sıçanlarda kan şekerinin anlamlı olarak düşmediğini bildirmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak, sitagliptinin kan şekeri düzeyini düşürücü etkinliğinin doza bağımlı olduğunu düşünmek mantıklıdır. Buna ek olarak, kan şekerinde düşüş gözlenen çalışmalarda sitagliptin tedavi süresinin 4-13 hafta arasında değişkenlik gösterdiği dikkat çekmektedir. Ne var ki, çalışmamızda

sadece 4 hafta tedavi yapılmıştır. Kan şekerinin istenilen ölçüde düşmemesinde söz konusu etkinin 4 haftadan daha uzun bir tedavi sürecini gerektirmesinin de katkısı olabilir. Öte yandan, Vellecco ve ark. (2016), genetik tip 1 diyabet modeli olan NOD farelere 4 hafta boyunca 0.3 ve 1 mg/kg/gün linagliptin tedavisi uygulamış ve kan şekerinin düşmediğini bildirmiştir. Aynı gruptan farklı bir ilaç kullanmış olmakla beraber, Vellecco ve ark. (2016)'nın da 4 haftalık tedavi sonucu kan şekerinde düşüş gözlememesi sonuçlarımızı desteklemektedir. Adı geçen çalışmada metabolik kontrol sağlanamadığı halde, aortadaki gevşeme yanıtlarının düzeldiği bulunmuş ve linagliptinin metabolik etkiden bağımsız vasküler yararına dikkat çekilmiştir (Vellecco ve ark., 2016). Bu bulgudan da yola çıkarak, vasküler parametrenin kan şekerini belirgin olarak düşürmeyen sitagliptin dozu varlığında değerlendirilmesi sitagliptinin glukoz metabolizmasından bağımsız etkinliğinin belirlenmesine olanak tanımaktadır.

İzoprenalin ile uyarılan  $\beta_2$ -AR aracılı vazodilatasyon yanıtının diyabetik sıçanlarda azaldığı bilinmektedir (Yakubu ve ark., 2012; Zeydanli ve ark., 2010). Çalışmamızda da benzer şekilde, diyabetik sıçan aortasında izoprenalin aracılı gevşeme yanıtının bozulduğu bulunmuştur. Öte yandan, sitagliptin tedavisi bu bozulmayı düzeltmemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç literatürle uyumlu görünmemektedir, nitekim, linagliptin tedavisi yapılan NOD farelerde (genetik tip 1 diyabet modeli) diyabette bozulan izoprenalin yanıtının iyileştiği gösterilmiştir (Vellecco ve ark., 2016). Aortada izoprenalin aracılı gevşeme yanıtının klasik olarak  $\beta_2$ -AR -adenilat siklaz-cAMP-PKA üzerinden olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak, voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanallarının kapanması ve  $K^+$  kanallarının açılmasının da bu gevşemede rolü vardır. Bu etki mekanizması göz önüne alındığında, iyileştirici etki görülmemesi, sitagliptin tedavisinin söz konusu yolda diyabete bağlı olarak bozulan bir ya da daha fazla bileşeni iyileştirememesinden kaynaklanabilir. En yalın şekliyle, diyabete bağlı olarak  $\beta_2$ -AR protein ifadesi azalmış olabilir ve bu da yanıtı yansıtmış olabilir. Nitekim, diyabette  $\beta$ -AR'lerin gen ifadesinin azaldığı bilinmektedir. Ne var ki, çalışmamız esas olarak, tedavinin  $\beta_3$ -AR'ler üzerindeki etkisine odaklandığı için,  $\beta_2$ -AR aracılı vazodilatasyon yolağındaki bileşenlerin

değişimi fonksiyonel ya da moleküler olarak incelenmemiştir. Bu da, sitagliptin tedavisinin izoprenalin aracılı gevşeme yanıtını düzeltmeyişinin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır.

Öte yandan, iyileşme gözlenmemesi, daha önce de vurgulandığı gibi, sitagliptinin dozu ya da uygulama süresi ile ilgili olabileceği gibi, direkt sitagliptinden de kaynaklanıyor olabilir. Nitekim Vellecco ve ark. (2016)'nın diyabetik NOD farelerde yaptığı çalışmada dipeptid mimetik yapıya sahip sitagliptin ile nonpeptidomimetik yapıli linagliptin in vitro olarak yol açtıkları vazodilatasyon yönünden karşılaştırılmış ve linagliptinin daha etkin olduğu bulunmuştur. Bu nedenle de, araştırmacılar vasküler parametreleri incelemek için linagliptini tercih ettiklerinin altını çizmiştir (Vellecco ve ark., 2016). Bu noktadan hareketle, sitagliptin tedavili sıçanlarda izoprenalin aracılı gevşeme yanıtlarının düzelmemesi sitagliptinin vazodilatör etkinliğinin diğer inkretin mimetiklere göre daha düşük olması ile de açıklanabilir. Çalışmamızda, sitagliptinin hem kan şekerinin düşürmemesini, hem de izoprenalin yanıtlarını düzeltmemesini birbiriyle ilişkilendirmek hataya yol açabilir. Şöyle ki; Vellecco ve ark. (2016) da linagliptin tedavisi ile kan şekerini düşürememiştir, ne var ki, vasküler yanıtları iyileştirmiştir. Bu bulguyu da linagliptinin glukozdan bağımsız direkt vazomodülatör etkinliği olarak ifade etmiştir. Gliptinlerin bu şekilde, glukozdan bağımsız direkt etkisini gösteren çalışmalardan biri de Shah ve ark. (2011b)'ninkidir. Söz konusu araştırmada, C57BL/6 farelerin aortasında in vitro alogliptin uygulamasının vazodilatasyona yol açtığı, bu yanıtın GLP-1'den bağımsız olarak NO ve EDHF aracılı olduğunu bildirilmiştir (Shah ve ark., 2011b).

Çalışmamızın esas amacı aortadaki varlığı ve vazodilatör etkisi ilk defa 1999 yılında Trochu ve ark. tarafından gösterilen  $\beta_3$ -AR aracılı vazodilatasyon yanıtının diyabette ve sitagliptin tedavisine bağıli olarak ne şekilde değiştiğinin incelenmesidir. Diyabetik aortada  $\beta_3$ -AR aracılı yanıtın değişip değişmediğı bugüne kadar araştırılmamıştır. Benzer şekilde, sitagliptin ya da diğer inkretin mimetik ilaçların  $\beta_3$ -AR aracılı yanıtlar üzerine etkisinin olup olmadığı da bilinmemektedir. Aslında bu

grup ilaçların aortada  $\beta_3$ -AR aracılı yanıtları etkileyeceğini düşünmek çok mantıksız görünmemektedir. Şöyle ki; literatür bilgisi inkretin mimetiklerin aortada NO-guanilat siklaz-cGMP üzerinden endotel bağımlı olarak gevşemeye aracılık ettiğini ortaya koymaktadır (Vellecco ve ark., 2016). Öte yandan,  $\beta_3$ -AR'lerin de damarda aynı yolak üzerinden endotel bağımlı olarak eNOS-NO-cGMP yolağı üzerinden gevşeme yaptığı bilinmektedir (Flacco ve ark., 2013; Rautureau ve ark., 2002; Trochu ve ark., 1999). Öte yandan, Ignarro ve ark. (2002)  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtının endotelden bağımsız bir bileşeni de olduğu öne sürmüştür. Çalışmamızda, aortadaki  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtlarının ne diyabetik grupta ne de sitagliptin tedavili grupta anlamlı farklılık göstermediği görülmektedir. Diyabetik ve tedavili grupta yanıtın artma eğilimde olduğu görülmektedir, ne var ki bu artış istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Western blot ve immunohistokimya çalışmaları da aslında bu bulguyu desteklemektedir, nitekim her ikisinde de  $\beta_3$ -AR protein ifadesinin diyabetik ve tedavili gruplarda artma eğiliminde olmakla birlikte, anlamlı farklılık göstermediğini ortaya koymaktadır. eNOS inhibitörü varlığında  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtının bozulması ise, sinyal yolağında eNOS'un rolünü doğrulamaktadır. Öte yandan, çalışmamızda,  $\beta_3$ -AR'nin sinyal yolağında yer alan total eNOS protein ifadesinin diyabetik ve tedavili grupta artma eğiliminde olduğu bulunmuştur. eNOS'un aktivasyonunun göstergesi olan fosforillenmiş eNOS/total eNOS oranının ise diyabetik grupta anlamlı değişmediği, tedavili grupta ise belirgin oranda arttığı gözlenmiştir.

İnkretin mimetiklerle yapılan diğer çalışmalar total eNOS protein ifadesi ve eNOS fosforilasyonu ile ilgili bulgularımızı desteklemektedir. Ding ve Zhang (2012), insan umbilikal ven endotelyal hücrelerine (HUVEC) 500-5000 pmol/L GLP-1 uygulamışlar ve bu durumda eNOS aktivasyon ve fosforilasyonunun (serin 1177) beş dakika sonra arttığını bulmuşlardır. Uygulamadan 48 saat sonra ise total eNOS protein ifadesi artarken, mRNA ifadesi değişmemiştir. Bu çalışmada, benzer şekilde, eksenatid ve GLP-1(9-36) eNOS aktivitesinin, fosforilasyonunun ve total protein ifadesinin arttığı gösterilmiştir. GLP-1 ve eksenatidden farklı olarak, GLP-1(9-36) sadece eNOS protein ifadesini değil, aynı zamanda mRNA ifadesini de artırmıştır.

Öte yandan, sitagliptin ya da eksendin(9-39)'in tek başına ya da kombinasyon halinde uygulanması ise eNOS aktivitesindeki, fosforilasyonundaki ve total protein ifadesindeki GLP-1 aracılı yükselmeyi kısmen bloke etmiştir (Ding ve Zhang, 2012). Bu bulgudan yola çıkarak, HUVEC'de GLP-1'in eNOS üzerindeki etkisini kısmen GLP-1 reseptörü aracılı kısmen ise GLP-1(9-36) üzerinden gösterdiğine vurgu yapılmıştır. DPP4 inhibitörlerinin insan vasküler endotel hücrelerindeki etkisinin GLP-1 aracılı ve GLP-1'den bağımsız bileşenlerinin olduğu Hu ve ark. (2013) tarafından da doğrulanmıştır. Önceden de belirtildiği gibi, çalışmamızda eNOS protein ifadesinin sitagliptin tedavili gruptaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Sitagliptinin bir DPP4 inhibitörü olduğu düşünüldüğünde, eNOS protein ifadesinde artış gözlenmemesi, Ding ve Zhang (2012)'ın da ileri sürdüğü gibi, beklenen artışta kısmen GLP-1(9-36)'in de etkisinin bulunması ve sitagliptinin GLP-1'in bu türeve dönüşümü engellemesi ile açıklanabilir. Buna karşın, çalışmamızda eNOS fosforilasyonunun sitagliptin tedavisine bağlı olarak anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. eNOS protein ifadesi değişmediği halde fosforilasyonun artması ise sitagliptin tedavisi sonucunda GLP-1'in GLP-1 reseptörü üzerinden olan etkinliğinin artması ile ilişkilendirilebilir. Öte yandan, bulgularımız Matsubara ve ark. (2012)'nın sonuçları ile örtüşmektedir. Söz konusu çalışmada 16 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenen ve apoE geni çıkarılmış farelere 200mg/kg/gün desflorositagliptin tedavisi yapılmış ve aortada total eNOS protein ifadesi değişmezken, eNOS fosforilasyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada HUVEC'de desflorositagliptinin GLP-1 aktivitesini artırarak cAMP/PKA yolağı üzerinden eNOS fosforilasyonuna yol açtığı ve böylece endotelial inflamasyonu, yaşlanmayı ve apoptozisi azalttığı bulunmuştur. L-NAME uygulaması yapıldığında yararlı etkinin ortadan kalkması ise eNOS'un rolünü doğrulamaktadır. Matsubara ve ark. (2012), desflorositagliptin tedavisi ile eNOS fosforilasyonunu artırmanın yüksek yağlı diyetle bağlı olarak gelişen endotelial disfonksiyonu iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgulardan farklı olarak; Wang ve ark. (2017) ise ZDF sıçanlarda total eNOS protein ifadesinin anlamlı olarak azaldığını ve sitagliptin tedavisi sonucunda ise düzelterek kontrol seviyesine geldiğini göstermiştir (Wang ve ark., 2017).

$\beta_3$ -AR aracılı vazodilatasyon şu şekilde gerçekleşmektedir; eNOS aracılı olarak oluşan NO, endotelial hücrelerden damar düz kas hücrelerine difüze olur ve sGC'nin hem kısmına bağlanır, böylece cGMP oluşur, böylece PKG aktive olur (Munzel ve ark., 2003; Rameshrad ve ark., 2016). PKG, hücre içine  $Ca^{+2}$  girişini inhibe eder ve hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyi azalır.  $Ca^{+2}$  kontraktil elementlerden ayrılır ve gevşeme meydana gelir. Öte yandan, vazodilatasyonda cGMP ile aktive olan myosin hafif zincir fosfatazların (Moncada ve Higgs, 1993) ve ATP aracılı potasyum (K-ATP) kanallarının (Sasaki ve ark., 2000) da rolü vardır. Bu sinyal yolağı göz önüne alındığında, ayrıca, total eNOS proteinindeki artış eğilimi ve eNOS fosforilasyonunun anlamlı olarak arttığı düşünüldüğünde, sitagliptin tedavili grupta  $\beta_3$ -AR sinyal yolağının bir şekilde uyarıldığı düşünülebilir. Ne var ki, bu grupta selektif  $\beta_3$ -AR agonisti CL 316,243 ile uyarılan gevşeme yanıtları anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Bu durumda, bir olasılıkla, eNOS aktivasyonuna karşın yeterli düzeyde NO üretilmemiş olabilir ve bu da yolağın diğer aşamaları olan guanilat siklaz aktivasyonunu ve cGMP oluşumunu etkilemiş olabilir. Farklı bir olasılıkla, NO üretimi artmış olsa bile, bu artış sGC-cGMP-PKG gibi yolağın sonraki aşamalarının aynı oranda uyarılmasına yol açmamış olabilir. Kısacası, eNOS'un artış eğilimi ya da fosforilasyonunun artması, sonraki aşamaların da benzer şekilde değişime uğrayacağını göstermemektedir. Bu noktadan hareketle,  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtının diyabetik ya da sitagliptin tedavili grupta istatistiksel anlamlı olarak değişmemesi, yolağın diğer bileşenlerinin tedaviden eNOS kadar etkilenmemiş olması ile açıklanabilir. Yolağın tüm bileşenlerinin fonksiyonel ve moleküler olarak ayrıntılı bir biçimde incelenmesi bu soruların yanıtlanmasına yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda, diyabetik sıçanların aortasında media tabakasının kalınlaştığı bulunmuştur. Ne var ki, sitagliptin tedavili sıçanlarda bu kalınlaşma anlamlı olarak azalmakla birlikte, kontrol seviyesine ulaşmamıştır. Bu bulgumuz diğer literatür bulguları ile örtüşmektedir, nitekim diğer çalışmalarda da diyabetik aortada intima ve media tabakasının kalınlaştığını gösterilmiştir (Tang ve ark., 2016a; Tang ve ark.,

2016b; Wang ve ark., 2017). Araştırmacılar sitagliptin tedavisi ile bu kalınlaşmanın anlamlı olarak azaldığını bulmuştur. Buna ek olarak, çalışmamızda, diyabetik sıçanların aortasında kollajen pozitif alanların arttığı gözlenmiştir. Kollajen birikimi sitagliptin tedavisi ile belirgin olarak azalsa da, kontrol seviyesine ulaşmamıştır. Sonuçlarımız sitagliptin tedavisinin diyabetik damarda bozulan histolojik parametreleri bir ölçüde düzelttiğini göstermektedir. Bu kısmi iyileşmenin mekanizmasının aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Sonuç olarak, sitagliptin tedavisi uygulanan sıçanların diyabetik aortada bozulan  $\beta_2$ -AR aracılı gevşemeleri düzeltmemesi ve  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtlarını da anlamlı olarak değiştirmemesi sitagliptinin diyabetik vasküler disfonksiyona yararlı olmadığını düşündürmektedir. Ne var ki, bu sonucun sitagliptin tedavi dozu ya da süresi ile ilişkili olup olmadığı olasılığı da göz önüne alınmalıdır. Sitagliptinin uygulanan dozda kan şekerini de belirgin olarak düşürmemesi, ilacın metabolik ve vasküler etkisinin bağlantılı olduğu fikrini akla getirirse de, hem linagliptin ile yapılan çalışmada ortaya konan glukozdan bağımsız vasküler yarar, hem de diyabetik olmayan hipertansif ya da aterosklerotik hayvan modellerinde gözlenen vazoprotektif etki bu olasılığı zayıflatmaktadır. Sitagliptinin vasküler etkilerinin farklı doz ve tedavi süreleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmemesi, ayrıca,  $\beta_2$  ve  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıt yolağındaki bileşenlerin fonksiyonel ve moleküler olarak ayrıntılı olarak değerlendirilmemesi çalışmamızın eksik noktalarıdır. Sonraki çalışmalarda, bu noktaların aydınlatılması sitagliptinin olası vasküler koruyucu etkisinin belirlenmesinde yararlı olacaktır.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız boyunca elde ettiğimiz bulgular sonucunda 14 haftalık diyabet sonrasında sıçanlarda torasik aorta kasılma yanıtlarının kontrol gruba göre arttığı, izoprenalin aracılı gevşeme yanıtlarının da azaldığı görülmüştür. Yanı sıra elde edilen histopatolojik bulgularda 14 haftalık diyabetin sıçan aortasında kalınlaşmaya yol açtığı, ayrıca bu dokularda kollajen birikiminin de arttığı gösterilmiştir. Bu çerçevede 14 haftalık diyabetin vasküler hasar oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir.

Dört haftalık sitagliptin tedavisinin sıçanların beden ağırlıkları ya da kan şekeri değerleri üzerinde herhangi bir iyileştirici etkisinin olmadığı görülmüştür. Artan aorta kasılma yanıtlarının sitagliptin tedavisi ile bir miktar düştüğü, ancak tedavinin azalan izoprenalin aracılı gevşeme yanıtları üzerinde olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı gözlenmiştir. Buna karşın, histopatolojik bulgular sonucunda sitagliptin tedavisinin diyabetle artan kollajen miktarını düşürdüğü ve kalınlaşan aorta media katmanını azalttığı görülmüştür. Bu bulgular, vasküler hasar ile gözlenen morfolojik değişimler üzerinde sitagliptin tedavisinin iyileştirici etkinliği olduğunu, buna karşın, bu ilacın vasküler işlevselliğin göstergesi olan kasılma ya da gevşeme yanıtlarına beta adrenerjik reseptörler üzerinden istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığını ortaya koymaktadır.

Diğer taraftan  $\beta_3$ -AR aracılı damar gevşeme yanıtlarının gruplar arasında anlamlı olarak değişmediği gözlenmiştir. Bu bulgular, western blot analizleri ve immunohistokimya deneyleri sonucunda  $\beta_3$ -AR protein düzeyleri ve bu reseptörlerin sıçan aortasındaki lokalizasyonu açısından üç grup arasında da anlamlı bir fark bulunmamasıyla desteklenmiştir. Bunlara ek olarak,  $\beta_3$ -AR aracılı damar gevşeme yanıtlarının eNOS yolağı üzerinden gerçekleştiği bilgisinden hareketle, eNOS inhibitörü L-NAME varlığında tekrarlanan  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtları bakımından da farklılık bulunamamıştır. Ne var ki, western blot analizleri peNOS

protein düzeylerinin sitagliptin tedavisiyle anlamlı derecede arttığını göstermiş, dolayısıyla sitagliptinin eNOS yolağını uyardığı sonucuna ulaşılmıştır.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde  $\beta_3$ -AR aracılı damar gevşeme yanıtları üzerinde sitagliptinin anlamlı bir etkisi olmadığı görülmektedir. Ancak seçilen doz ya da uygulanan tedavi süresinin sonuçları etkilemiş olması olası görünmektedir. Bu doğrultuda, farklı doz ve tedavi süreçleri ile yeni araştırmalar yapılması sitagliptin etkiliğinin daha sağlıklı değerlendirilmesine yardımcı olacaktır. Öte yandan, çalışmamızda klinik bulgulara yer verilmemiş, yalnızca sıçan aortası üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Tedavinin insanlar üzerindeki olası etkilerinin değerlendirilmesi için yeni klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlara ek olarak, sitagliptinin eNOS yolağını aktive ettiği gösterilmiş, ancak, bunun mekanizması aydınlatılamamıştır. Yapılacak çalışmalarla, olası mekanizmalar üzerine odaklanılması hedeflenmektedir.

## ÖZET

### **Streptozotosin Diyabetik Sıçan Aortasında Beta 3-Adrenoseptör Aracılı Yanıtlara Sitagliptinin Olası Etkileri**

Kronik diyabetik bireylerde kardiyovasküler hastalıkların görülme riski önemli ölçüde artmaktadır. Diyabete bağlı olarak endotel aracılı gevşeme yanıtlarının azaldığı, bu durumun da vasküler endotelial disfonksiyona yol açtığı gösterilmiştir. Klasik  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -AR'lere ek olarak  $\beta_3$ -AR'lerin de damar endotelinde yerleştiği ve nitrikoksit aracılı olarak gevşeme yanıtına yol açtığı bulunmuştur. Dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) inhibisyonu, glukagon benzeri peptid- 1 (GLP-1) ve glukozu bağımlı insülinotropik peptid (GIP) gibi inkretinlerin parçalanmasını önleyerek kan dolaşım sisteminde inkretin seviyelerini arttırmaktadır. Artan inkretin seviyeleri, yemek sonrası insülin etkinliğinin uzamasını sağlamakta, böylece DPP4 inhibitörleri diyabet tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Araştırmalar DPP4 inhibitörlerinin anti-inflamatuar, anti-aterosklerotik etkileri ve damar gevşeme yanıtlarını artırıcı özellikleriyle vasküler sistem üzerinde koruyucu etkinliği olduğunu ortaya koymuştur. Öte yandan, DPP4'ün akut inhibisyonunun normal damar fonksiyonları üzerindeki etkilerinin GLP-1'den bağımsız mekanizmalar aracılığıyla olduğunu gösteren bir çalışma da bulunmaktadır. Planlanan projede diyabete bağlı olarak gelişen vasküler hasarın düzeltilmesinde bir DPP4 inhibitörü olan sitagliptinin olası etkinliği  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtı üzerinden değerlendirilmiştir. Çalışmada bu amaçla kontrol, diyabetik ve sitagliptin tedavili diyabetik sıçan gruplarının aortasında  $\beta_3$ -AR agonisti CL 316,243 aracılı gevşeme yanıtı incelenmiş ve etki mekanizmasının eNOS yolağı ile ilişkisi araştırılmış, buna ek olarak,  $\beta_3$ -AR ve eNOS/peNOS protein düzeylerine bakılarak gen ifade düzeyinde de bu reseptörler değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal olarak da bu reseptörler incelenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda  $\beta_3$ -AR aracılı gevşeme yanıtı üzerinde sitagliptin tedavisinin bir etkisi olmadığı görülmüş, aynı zamanda  $\beta_3$ -AR protein ifade düzeylerinin de gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Ne var ki, peNOS/eNOS protein oranının sitagliptin tedavisiyle anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda sitagliptin tedavisinin eNOS yolağını uyardığı, ancak bu uyarının  $\beta_3$ -AR aracılı olmadığı gösterilmiştir. Sitagliptin ile eNOS yolağı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** aorta, beta 3 adrenoseptör, diyabet, endotelial disfonksiyon, sitagliptin.

## SUMMARY

### **The Possible Effects of Sitagliptin on Beta 3 Adrenoceptor Mediated Responses in Streptozotocin Diabetic Rat Aorta**

Cardiovascular risk is highly increased in individuals with chronic diabetes. Endothelium dependent relaxation response has been shown to be decreased in diabetes and this leads to vascular endothelial dysfunction gradually. In addition to classical  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -AR, a third subtype,  $\beta_3$ -AR has been shown to exist in vessel endothelium and mediate vasorelaxation. Inhibition of DPP4 increases levels of incretin in blood circulation by preventing the degradation of incretins such as glucagon like peptide (GLP-1) and glucose dependent insulinotropic peptide (GIP). Increased incretin levels provide prolonged postprandial insulin efficiency. Thus, DPP4 inhibitors have been used on diabetes treatment. DPP4 inhibitors have been shown to be protective on vascular system since they have antiinflammatory and antiatherosclerotic effects and increase vasodilatation response. On the other hand, the vascular effect of acute inhibition of DPP4 has been found to be independent of GLP-1. In this research project, the possible beneficial effects of sitagliptin on diabetic vascular damage have been evaluated in terms of  $\beta_3$ -AR mediated vasodilatation response. For this purpose,  $\beta_3$ -AR mediated relaxation response has been studied with CL 316,243, a  $\beta_3$ -AR agonist, in the aorta rings of control, diabetic and sitagliptin treated diabetic rats and the relationship between the mechanism of this relaxation and eNOS pathway has been investigated. In addition, the efficiency of sitagliptin has been evaluated as gene expression levels by western blot analysis and immunohistochemical assay. It has been observed that sitagliptin had no significant effect on  $\beta_3$ -AR mediated relaxation response. These results were supported with the finding that  $\beta_3$ -AR protein expression was not changed among the groups. However, peNOS/eNOS ratio was increased markedly in sitagliptin treated group which points the stimulating effect of this drug on eNOS pathway. It is shown that this stimulation was not related to  $\beta_3$ -AR, so further studies are needed to explain the relationship between sitagliptin and eNOS pathway.

**Key words:** aorta, beta 3 adrenoceptor, diabetes, endothelial dysfunction, sitagliptin.

## KAYNAKLAR

- ADA (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **37 Suppl 1**: S81-90.
- AHREN B (2008). Emerging dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of diabetes. *Expert Opin Emerg Drugs*, **13**: 593-607.
- AIRD WC (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, **100**: 158-173.
- AL-AWAR A, KUPAI K, VESZELKA M, SZUCS G, ATTIEH Z, MURLASITS Z, TÖRÖK S, PÓSA A, VARGA C (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Diabetes Research*, **2016**.
- ALEXANDRU N, BADILA E, WEISS E, COCHIOR D, STEPIEN E, GEORGESCU A (2016). Vascular complications in diabetes: Microparticles and microparticle associated microRNAs as active players. *Biochem Biophys Res Commun*, **472**: 1-10.
- ARAKAWA M, MITA T, AZUMA K, EBATO C, GOTO H, NOMIYAMA T, FUJITANI Y, HIROSE T, KAWAMORI R, WATADA H (2010). Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes*, **59**: 1030-1037.
- ARCH JRS, KAUMANN AJ (1993).  $\beta_3$  and Atypical  $\beta$ -Adrenoceptors. *Medicinal Research Reviews*, **13**: 663-729.
- AUDIGANE L, KERFANT BG, EL HARCHI A, LORENZEN-SCHMIDT I, TOUMANIANTZ G, CANTEREAU A, POTREAU D, CHARPENTIER F, NOIREAUD J, GAUTHIER C (2009). Rabbit, a relevant model for the study of cardiac beta 3-adrenoceptors. *Exp Physiol*, **94**: 400-411.
- AVOGARO A, ALBIERO M, MENEGAZZO L, DE KREUTZENBERG S, FADINI GP (2011). Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care*, **34 Suppl 2**: S285-290.
- AVOGARO A, FADINI GP, GALLO A, PAGNIN E, DE KREUTZENBERG S (2006). Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **16 Suppl 1**: S39-45.
- BAN K, NOYAN-ASHRAF MH, HOEFER J, BOLZ SS, DRUCKER DJ, HUSAIN M (2008). Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*, **117**: 2340-2350.
- BERLAN M, GALITZKY J, MONTASTRUC JL (1995). Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Fundam Clin Pharmacol*, **9**: 234-239.

- BLUESTONE JA, HEROLD K , EISENBARTH G (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, **464**: 1293-1300.
- BONETTI PO, LERMAN LO , LERMAN A (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**: 168-175.
- CICEK FA, TOKCAER-KESKIN Z, OZCINAR E, BOZKUS Y, AKCALI KC , TURAN B (2014). Di-peptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin protects vascular function in metabolic syndrome: possible role of epigenetic regulation. *Mol Biol Rep*, **41**: 4853-4863.
- CREAGER MA, LUSCHER TF, COSENTINO F , BECKMAN JA (2003). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*, **108**: 1527-1532.
- DANAEI G, FINUCANE MM, LU Y, SINGH GM, COWAN MJ, PACIOREK CJ, LIN JK, FARZADFAR F, KHANG YH, STEVENS GA, RAO M, ALI MK, RILEY LM, ROBINSON CA , EZZATI M (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, **378**: 31-40.
- DE VRIESE AS, VERBEUREN TJ, VAN DE VOORDE J, LAMEIRE NH , VANHOUTTE PM (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*, **130**: 963-974.
- DELBIN MA , TRASK AJ (2014). The diabetic vasculature: physiological mechanisms of dysfunction and influence of aerobic exercise training in animal models. *Life Sci*, **102**: 1-9.
- DENG F , WANG S (2016). Endothelial Microparticles Act as Novel Diagnostic and Therapeutic Biomarkers of Diabetes and Its Complications: A Literature Review. **2016**: 9802026.
- DING L , ZHANG J (2012). Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin*, **33**: 75-81.
- DRUCKER DJ , NAUCK MA (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*, **368**: 1696-1705.
- DURINX C, LAMBEIR AM, BOSMANS E, FALMAGNE JB, BERGHMANS R, HAEMERS A, SCHARPE S , DE MEESTER I (2000). Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem*, **267**: 5608-5613.
- ERDOGDU O, NATHANSON D, SJOHOLM A, NYSTROM T , ZHANG Q (2010). Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, **325**: 26-35.
- FADINI GP , AVOGARO A (2011). Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1. *Vascul Pharmacol*, **55**: 10-16.

- FELETOU M. (2011). Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease. In *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences Copyright (c) 2011 by Morgan & Claypool Life Sciences Publishers.
- FELETOU M, TANG EH , VANHOUTTE PM (2008). Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control. *Front Biosci*, **13**: 4198-4217.
- FISSLTHALER B, BENZING T, BUSSE R , FLEMING I (2003). Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. *Nitric Oxide*, **8**: 253-261.
- FLACCO N, SEGURA V, PEREZ-ASO M, ESTRADA S, SELLER JF, JIMENEZ-ALTAYO F, NOGUERA MA, D'OCON P, VILA E , IVORRA MD (2013). Different beta-adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *Br J Pharmacol*, **169**: 413-425.
- FORST T, HEISE T , PLUM-MORSCHER L (2016). Pharmacological Intervention in Type 2 Diabetes Mellitus - A Pathophysiologically Reasoned Approach? *Curr Diabetes Rev*, **12**: 429-439.
- FURCHGOTT RF , ZAWADZKI JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-376.
- GAUTHIER C, ROZEC B, MANOURY B , BALLIGAND JL (2011). Beta-3 adrenoceptors as new therapeutic targets for cardiovascular pathologies. *Curr Heart Fail Rep*, **8**: 184-192.
- GOVERS R , RABELINK TJ (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**: F193-206.
- GRIFFITH OW , STUEHR DJ (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, **57**: 707-736.
- HINK U, LI H, MOLLNAU H, OELZE M, MATHEIS E, HARTMANN M, SKATCHKOV M, THAISS F, STAHL RA, WARNHOLTZ A, MEINERTZ T, GRIENDLING K, HARRISON DG, FORSTERMANN U , MUNZEL T (2001). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*, **88**: E14-22.
- HOLST JJ (2004). On the physiology of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res*, **36**: 747-754.
- HOLST JJ , GROMADA J (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **287**: E199-206.
- HONG WJ, PETELL JK, SWANK D, SANFORD J, HIXSON DC , DOYLE D (1989). Expression of dipeptidyl peptidase IV in rat tissues is mainly regulated at the mRNA levels. *Exp Cell Res*, **182**: 256-266.
- HSUEH WA, LYON CJ , QUIÑONES MJ (2004). Insulin resistance and the endothelium. *The American Journal of Medicine*, **117**: 109-117.

- HU Y, LIU H, SIMPSON RW , DEAR AE (2013). GLP-1-dependent and independent effects and molecular mechanisms of a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor in vascular endothelial cells. *Mol Biol Rep*, **40**: 2273-2279.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. (2015). IDF Diabetes Atlas - 7th Edition. Erişim:[<http://www.diabetesatlas.org/>], Erişim Tarihi: 5/2/2017.
- IGNARRO LJ, BYRNS RE, TRINH K, SISODIA M , BUGA GM (2002). Nebivolol: a selective beta(1)-adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *Nitric Oxide*, **7**: 75-82.
- ISHII H, KOYA D , KING GL (1998). Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med (Berl)*, **76**: 21-31.
- JIN SN, WEN JF, LI X, KANG DG, LEE HS , CHO KW (2011). The mechanism of vasorelaxation induced by ethanol extract of *Sophora flavescens* in rat aorta. *J Ethnopharmacol*, **137**: 547-552.
- KAHN SE (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, **46**: 3-19.
- KANG KT, SULLIVAN JC, SPRADLEY FT, D'USCIO LV, KATUSIC ZS , POLLOCK JS (2011). Antihypertensive therapy increases tetrahydrobiopterin levels and NO/cGMP signaling in small arteries of angiotensin II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **300**: H718-724.
- KHALIL H (2016). Diabetes microvascular complications-A clinical update. *Diabetes Metab Syndr*.
- KING GL (1996). The role of hyperglycaemia and hyperinsulinaemia in causing vascular dysfunction in diabetes. *Ann Med*, **28**: 427-432.
- KIRPICHNIKOV D , SOWERS JR (2001). Diabetes mellitus and diabetes-associated vascular disease. *Trends Endocrinol Metab*, **12**: 225-230.
- KOZAKOVA M , PALOMBO C (2016). Diabetes Mellitus, Arterial Wall, and Cardiovascular Risk Assessment. *Int J Environ Res Public Health*, **13**: 201.
- KUBOTA Y, MIYAMOTO M, TAKAGI G, IKEDA T, KIRINOKI-ICHIKAWA S, TANAKA K , MIZUNO K (2012). The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin improves vascular endothelial function in type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*, **27**: 1364-1370.
- LAU YS, LING WC, MURUGAN D , MUSTAFA MR (2015). Boldine Ameliorates Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction: Therapeutic Implication for Hypertension and Diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol*, **65**: 522-531.
- LEE TM, CHEN WT , CHANG NC (2016). Sitagliptin decreases ventricular arrhythmias by attenuated glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)-dependent resistin signalling in infarcted rats. *Biosci Rep*, **36**.

- LIN KY, ITO A, ASAGAMI T, TSAO PS, ADIMOOLAM S, KIMOTO M, TSUJI H, REAVEN GM , COOKE JP (2002). Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, **106**: 987-992.
- LIU L, LIU J, WONG WT, TIAN XY, LAU CW, WANG YX, XU G, PU Y, ZHU Z, XU A, LAM KS, CHEN ZY, NG CF, YAO X , HUANG Y (2012). Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism. *Hypertension*, **60**: 833-841.
- LIU YS, HUANG ZW, WANG L, LIU XX, WANG YM, ZHANG Y , ZHANG M (2015). Sitagliptin alleviated myocardial remodeling of the left ventricle and improved cardiac diastolic dysfunction in diabetic rats. *J Pharmacol Sci*, **127**: 260-274.
- LOSCALZO J (1995). Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med*, **333**: 251-253.
- MARCHETTI P, DOTTA F, LAURO D , PURRELLO F (2008). An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regulatory Peptides*, **146**: 4-11.
- MAS M (2009). A Close Look at the Endothelium: Its Role in the Regulation of Vasomotor Tone. *European Urology Supplements*, **8**: 48-57.
- MASON RP, JACOB RF, KUBANT R, CISZEWSKI A, CORBALAN JJ , MALINSKI T (2012). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition with saxagliptin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure and sICAM-1 levels in hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, **60**: 467-473.
- MASON RP, JACOB RF, KUBANT R, WALTER MF, BELLAMINE A, JACOBY A, MIZUNO Y , MALINSKI T (2011). Effect of enhanced glycemic control with saxagliptin on endothelial nitric oxide release and CD40 levels in obese rats. *J Atheroscler Thromb*, **18**: 774-783.
- MATHEEUSSEN V, BAERTS L, DE MEYER G, DE KEULENAER G, VAN DER VEKEN P, AUGUSTYNS K, DUBOIS V, SCHARPE S , DE MEESTER I (2011). Expression and spatial heterogeneity of dipeptidyl peptidases in endothelial cells of conduct vessels and capillaries. *Biol Chem*, **392**: 189-198.
- MATSUBARA J, SUGIYAMA S, SUGAMURA K, NAKAMURA T, FUJIWARA Y, AKIYAMA E, KUROKAWA H, NOZAKI T, OHBA K, KONISHI M, MAEDA H, IZUMIYA Y, KAIKITA K, SUMIDA H, JINNOUCHI H, MATSUI K, KIM-MITSUYAMA S, TAKEYA M , OGAWA H (2012). A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol*, **59**: 265-276.
- MCINTOSH CH (2008). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and diabetes therapy. *Front Biosci*, **13**: 1753-1773.
- MOENS AL, YANG R, WATTS VL , BAROUCH LA (2010). Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*, **48**: 1088-1095.

- MONCADA S , ERUSALIMSKY JD (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**: 214-220.
- MONCADA S , HIGGS A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, **329**: 2002-2012.
- MONTAGNANI M, GOLOVCHENKO I, KIM I, KOH GY, GOALSTONE ML, MUNDHEKAR AN, JOHANSEN M, KUCIK DF, QUON MJ , DRAZNIN B (2002). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem*, **277**: 1794-1799.
- MORITOH Y, TAKEUCHI K, ASAKAWA T, KATAOKA O , ODAKA H (2008). Chronic administration of alogliptin, a novel, potent, and highly selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves glycemic control and beta-cell function in obese diabetic ob/ob mice. *Eur J Pharmacol*, **588**: 325-332.
- MUNZEL T, FEIL R, MULSCH A, LOHMANN SM, HOFMANN F , WALTER U (2003). Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*, **108**: 2172-2183.
- NAPOLI C , IGNARRO LJ (2009). Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res*, **32**: 1103-1108.
- NIELSEN LL (2005). Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Drug Discov Today*, **10**: 703-710.
- NISHIKAWA T, EDELSTEIN D, DU XL, YAMAGISHI S-I, MATSUMURA T, KANEDA Y, YOREK MA, BEEBE D, OATES PJ, HAMMES H-P, GIARDINO I , BROWNLEE M (2000a). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, **404**: 787-790.
- OSTO E, DOYTCHIEVA P, CORTEVILLE C, BUETER M, DORIG C, STIVALA S, BUHMANN H, COLIN S, ROHRER L, HASBALLA R, TAILLEUX A, WOLFRUM C, TONA F, MANZ J, VETTER D, SPLIETHOFF K, VANHOUTTE PM, LANDMESSER U, PATTOU F, STAELS B, MATTER CM, LUTZ TA , LUSCHER TF (2015). Rapid and body weight-independent improvement of endothelial and high-density lipoprotein function after Roux-en-Y gastric bypass: role of glucagon-like peptide-1. *Circulation*, **131**: 871-881.
- PERTICONE F, SCIACQUA A, MAIO R, PERTICONE M, MAAS R, BOGER RH, TRIPEPI G, SESTI G , ZOCCALI C (2005). Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*, **46**: 518-523.
- POTENZA MA, GAGLIARDI S, NACCI C, CARRATU MR , MONTAGNANI M (2009). Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem*, **16**: 94-112.
- QUEEN LR , FERRO A (2006). Beta-adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cell Mol Life Sci*, **63**: 1070-1083.

- RADENKOVIC M, STOJANOVIC M, POTPARA T , PROSTRAN M (2013). Therapeutic approach in the improvement of endothelial dysfunction: the current state of the art. *Biomed Res Int*, **2013**: 252158.
- RAMESHRAD M, BABAEI H, AZARMI Y , FOULADIA DF (2016). Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. *Life Sci*, **145**: 190-204.
- RAUTUREAU Y, TOUMANIANTZ G, SERPILLON S, JOURDON P, TROCHU JN , GAUTHIER C (2002). Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br J Pharmacol*, **137**: 153-161.
- REIMER RA, GROVER GJ, KOETZNER L, GAHLER RJ, JUNEJA P, LYON MR , WOOD S (2012). Sitagliptin reduces hyperglycemia and increases satiety hormone secretion more effectively when used with a novel polysaccharide in obese Zucker rats. *J Nutr*, **142**: 1812-1820.
- ROHRBORN D, WRONKOWITZ N , ECKEL J (2015). DPP4 in Diabetes. *Front Immunol*, **6**: 386.
- SALHEEN SM, PANCHAPAKESAN U, POLLOCK CA , WOODMAN OL (2015). The DPP-4 inhibitor linagliptin and the GLP-1 receptor agonist exendin-4 improve endothelium-dependent relaxation of rat mesenteric arteries in the presence of high glucose. *Pharmacol Res*, **94**: 26-33.
- SANCHEZ-FERRER C, VALLEJO S, ROMACHO T, VILLALOBOS L, WRONKOWITZ N, SELL H, ECKEL J , PEIRO C (2013). Dipeptidyl peptidase-4 impairs microvascular endothelial-dependant relaxation: The role of cyclooxygenase. *Diabetes*, **62**: A128.
- SARWAR N, GAO P, SESHASAI SR, GOBIN R, KAPTOGE S, DI ANGELANTONIO E, INGELSSON E, LAWLOR DA, SELVIN E, STAMPFER M, STEHOUWER CD, LEWINGTON S, PENNELLS L, THOMPSON A, SATTAR N, WHITE IR, RAY KK , DANESH J (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*, **375**: 2215-2222.
- SASAKI N, SATO T, OHLER A, O'ROURKE B , MARBAN E (2000). Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*, **101**: 439-445.
- SCHEEN AJ (2003). Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg*, **58**: 335-341.
- SHAH Z, KAMPFRATH T, DEIULIIS JA, ZHONG J, PINEDA C, YING Z, XU X, LU B, MOFFATT-BRUCE S, DURAIRAJ R, SUN Q, MIHAI G, MAISEYEU A , RAJAGOPALAN S (2011a). Long-term dipeptidyl-peptidase 4 inhibition reduces atherosclerosis and inflammation via effects on monocyte recruitment and chemotaxis. *Circulation*, **124**: 2338-2349.
- SHAH Z, PINEDA C, KAMPFRATH T, MAISEYEU A, YING Z, RACOMA I, DEIULIIS J, XU X, SUN Q, MOFFATT-BRUCE S, VILLAMENA F , RAJAGOPALAN S (2011b). Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. *Vascul Pharmacol*, **55**: 2-9.

- SHI Y , VANHOUTTE PM (2009). Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. *J Diabetes*, **1**: 151-162.
- SHI Y , VANHOUTTE PM (2017). Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes*.
- SHIMOMURA I, MATSUDA M, HAMMER RE, BASHMAKOV Y, BROWN MS , GOLDSTEIN JL (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*, **6**: 77-86.
- SILVA JUNIOR WS, GODOY-MATOS AF , KRAEMER-AGUIAR LG (2015). Dipeptidyl Peptidase 4: A New Link between Diabetes Mellitus and Atherosclerosis? *Biomed Res Int*, **2015**: 816164.
- SON JW , KIM S (2015). Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors and the Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes: A Tale of Three Studies. *Diabetes Metab J*, **39**: 373-383.
- SOOCH S, MARSHALL I (1997). Atypical  $\beta$ -Adrenoceptors in the Rat Vasculature. *Annals New York Academy of Sciences*, **812**: 211-212.
- STANKEVICIUS E, KEVELAITIS E, VAINORIUS E , SIMONSEN U (2003). [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)*, **39**: 333-341.
- SUN D, MAN W , ZHANG L (2016). Roles of Insulin Resistance, Endothelial Dysfunction and Life Style Changes in the Development of Cardiovascular Disease in Diabetic Patients. *Curr Drug Targets*.
- TANG S-T, ZHANG Q, TANG H-Q, WANG C-J, SU H, ZHOU Q, WEI W, ZHU H-Q , WANG Y (2016a). Effects of glucagon-like peptide-1 on advanced glycation endproduct-induced aortic endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: possible roles of Rho kinase- and AMP kinase-mediated nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathways. *Endocrine*, **53**: 107-116.
- TANG ST, SU H, ZHANG Q, TANG HQ, WANG CJ, ZHOU Q, WEI W, ZHU HQ , WANG Y (2016b). Sitagliptin inhibits endothelin-1 expression in the aortic endothelium of rats with streptozotocin-induced diabetes by suppressing the nuclear factor-kappaB/IkappaBalpha system through the activation of AMP-activated protein kinase. *Int J Mol Med*, **37**: 1558-1566.
- THORNBERRY NA , GALLWITZ B (2009). Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **23**: 479-486.
- TODD JA (2010). Etiology of Type 1 Diabetes. *Immunity*, **32**: 457-467.
- TROCHU JN, LEBLAIS V, RAUTUREAU Y, BEVERELLI F, LE MAREC H, BERDEAUX A , GAUTHIER C (1999). Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*, **128**: 69-76.

- USSHER JR , DRUCKER DJ (2012). Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr Rev*, **33**: 187-215.
- USSHER JR , DRUCKER DJ (2014). Cardiovascular actions of incretin-based therapies. *Circ Res*, **114**: 1788-1803.
- VAGHASIYA J, SHETH N, BHALODIA Y , MANEK R (2011). Sitagliptin protects renal ischemia reperfusion induced renal damage in diabetes. *Regul Pept*, **166**: 48-54.
- VALLANCE P (2001). Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk. *The Lancet*, **358**: 2096-2097.
- VAN BELLE TL, COPPIETERS KT , VON HERRATH MG (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*, **91**: 79-118.
- VAN POPPEL PC, NETEA MG, SMITS P , TACK CJ (2011). Vildagliptin improves endothelium-dependent vasodilatation in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **34**: 2072-2077.
- VANDERHEYDEN M, BARTUNEK J, GOETHALS M, VERSTREKEN S, LAMBEIR AM, DE MEESTER I , SCHARPE S (2009). Dipeptidyl-peptidase IV and B-type natriuretic peptide. From bench to bedside. *Clin Chem Lab Med*, **47**: 248-252.
- VANHOUTTE PM , MOMBOULI JV (1996). Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis*, **39**: 229-238.
- VANHOUTTE PM, SHIMOKAWA H, FELETOU M , TANG EH (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*, **219**: 22-96.
- VANHOUTTE PM, ZHAO Y, XU A , LEUNG SW (2016). Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res*, **119**: 375-396.
- VELLECCO V, MITIDIERI E, GARGIULO A, BRANCALEONE V, MATASSA D, KLEIN T, ESPOSITO F, CIRINO G , BUCCI M (2016). Vascular effects of linagliptin in non-obese diabetic mice are glucose-independent and involve positive modulation of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS)/caveolin-1 (CAV-1) pathway. *Diabetes Obes Metab*, **18**: 1236-1243.
- VERMA S , ANDERSON TJ (2002). Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, **105**: 546-549.
- WANG H, ZHOU Y, GUO Z, DONG Y, XU J, HUANG H, LIU H , WANG W (2017). Sitagliptin Attenuates Endothelial Dysfunction of Zucker Diabetic Fatty Rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 1074248417715001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks.  
Erişim:[[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GlobalHealthRisks\\_report\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf)]. Erişim Tarihi: 23/1/2017.

YAKUBU MA, SOFOLA OA, IGBO I , OYEKAN AO (2012). Impaired endothelium-dependent and -independent relaxation of aorta from diabetic rats. *Bratisl Lek Listy*, **113**: 59-63.

ZEYDANLI EN, BILGINOGLU A, TANRIVERDI E, GURDAL H , TURAN B (2010). Selenium restores defective beta-adrenergic receptor response of thoracic aorta in diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, **338**: 191-201.



## EKLER

### Ek-1. Etik Kurul Belgesi



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

#### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 16/09/2015  
TOPLANTI NO : 2015-15  
DOSYA NO : 2015-127  
KARAR NO : 2015-15-172

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Ebru Arıoğlu İnan'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Prof.Dr.V.Melih Altan, Ecz.Ceren Uyar Boztaş, Ecz.Ayhanım Elif Müderrisoğlu ve Ecz.Betül Rabia Erdoğan'ın katıldığı "Streptozotosin Diyabetik Sıçan Aortasında Beta-3-Adrenoseptör Aracılı Yanıtlara Sitagliptinin Olası Etkileri" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılması oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan  
Hayvan Sayısı : 66  
Geçerlilik Süresi : 01/12/2015-01/06/2017

| ETİK KURUL ÜYELERİ                         |                                       |                        |           |      |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-----------|------|
| Ünvanı / Adı / Soyadı                      | Uzmanlık Dalı                         | Kurumu                 | Cinsiyeti | İmza |
| Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU<br>(Başkan)    | Parazitoloji<br>Anabilim Dalı         | Veteriner<br>Fakültesi | E         |      |
| Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY<br>(Başkan Vekili) | Farmakoloji<br>Anabilim Dalı          | Eczacılık<br>Fakültesi | E         |      |
| Prof.Dr.Nuri YİĞİT<br>(Üye)                | Zooloji<br>Anabilim Dalı              | Fen Fakültesi          | E         |      |
| Prof.Dr.Fatin CEDDEN<br>(Üye)              | Hayvan<br>Yetiştirme<br>Anabilim Dalı | Ziraat<br>Fakültesi    | E         |      |
| Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU<br>(Üye)            | Çocuk<br>Cerrahisi<br>Anabilim Dalı   | Tıp Fakültesi          | E         |      |
| Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ<br>(Üye)             | Su Ürünler<br>Anabilim Dalı           | Ziraat<br>Fakültesi    | K         |      |
| Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ<br>(Üye)      | Tıbbi<br>Farmakoloji<br>Anabilim Dalı | Tıp Fakültesi          | K         |      |
| Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM<br>(Üye)          | Cerrahi<br>Anabilim Dalı              | Veteriner<br>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<br>(Üye)    | Veteriner<br>Hekimliği<br>Tarihi ve<br>Deontoloji<br>Anabilim Dalı | Veteriner<br>Fakültesi | E |                   |
| Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN<br>(Üye) | Deney<br>Hayvanları<br>Yetiştirme ve<br>Araştırma<br>Laboratuvarı  | Tıp Fakültesi          | E |                   |
| Vet.Hek.Dr.Akife KAYA<br>(Üye)      | Referans<br>Veteriner<br>Kliniği                                   | Serbest                | K | <i>Akife</i>      |
| Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE<br>(Üye)   | Veteriner<br>Hekimler<br>Derneği                                   | Serbest                | E | <i>Uzm. H. De</i> |
| Fatma Aysun ÇOSKUN<br>(Üye)         | İktisat                                                            | Serbest                | K |                   |

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Ayhanım Elif

**Soyadı:** Müderrisoğlu

**Doğum yeri ve tarihi:** Ankara, 1991

**Uyruğu:** TC

**Medeni durumu:** Bekar

**İletişim adresi ve telefonu:** Emek mah. 8.cad. 7.sk. 1/85 Çankaya/Ankara,  
05443930390

**Eğitim:** Ankara Atatürk Anadolu Lisesi (2005-2009)  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2009-2014)

**Yabancı dil:** İngilizce

**Stajlar:** Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (02.2014-04.2014)  
ADEKA İlaç San. Tic. A.Ş./ Ruhsatlandırma  
Departmanı (08.2013-09.2013)  
Harput Eczanesi (Ankara) (07.2012-08.2012)  
Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma  
Hastanesi (06.2012-07.2012)  
Harput Eczanesi (Ankara) (07.2011-08.2011)

**Mesleki Deneyim:** Trio Grup CRO, Klinik Araştırma Asistanı (CRA)  
(09.2014-01.2015)

**Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:** Türk Farmakoloji Derneği

**Bilimsel Yayınlar:**

Arioglu-Inan, E., Erdogan, R. B., **Muderrisoglu, A. E.**, Karaomerlioglu, I., Kayki-Mutlu, G., Onay-Besikci, A., & Altan, V. M. (2016). The effect of leptin treatment on in vivo cardiac parameters of streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolism*, 42(4), 296.

**Muderrisoglu, A. E.**, Erdogan, B. R., Yesilyurt, Z. E., Uyar-Boztas, C., Karaomerlioglu, I., Altan, VM., Arioglu-Inan, E. The effects of sitagliptin treatment on beta 3 adrenergic receptor mediated relaxation responses in streptozotocine-induced diabetic rat aorta. *Diabetes and Cardiovascular Disease (D&CVD) EASD Study Group Annual Meeting*, 22-24 November 2017, Milan, Italy.

**Müderrisoğlu, A. E.**, Çomoğlu T. (2010). İlaç Taşıyıcı Polimerik Partiküler Sistem Formülasyonlarına Genel Bakış. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 39(4): 343-368.

**Bilimsel Etkinlikler:**

TUBİTAK 115 S 564, Streptozotosin diabetik ratlarda kardiyak beta adrenerjik reseptör yanıtlarında leptinin olası rolü, 2015-2018, Bursiyer.

Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu (17L0237002), Streptozotosin diyabetik sıçan aortasında beta 3-adrenoseptör aracılı yanıtlara sitagliptinin olası etkileri, 03.2017-09.2017, Araştırmacı.