TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SODYUM GLUKOZ ORTAK TAŞIYICI İNHİBİTÖRLERİNİN TİP 2 DİYABETES MELLİTUS OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN KALP DOKUSUNDAKİ microRNA'LAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

HÜMEYSA KİYAK KIRMACI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. HATİCE KÜBRA ELÇİOĞLU
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SODYUM GLUKOZ ORTAK TAŞIYICI İNHİBİTÖRLERİNİN TİP 2 DİYABETES MELLİTUS OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN KALP DOKUSUNDAKİ microRNA'LAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

HÜMEYSA KİYAK KIRMACI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. HATİCE KÜBRA ELÇİOĞLU
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hümeysa Kiyak Kırmacı

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim ve akademik gelişimim boyunca deneyimi ve bilgi birikimleri ile mesleki gelişimime katkı sunan, başarılı bir doktora süreci geçirmemi en az benim kadar isteyen ve bunun için emekler harcayan sayın danışmanım Prof. Dr. Hatice Kübra Elçioğlu'na,

Bilgi birikimi, deneyimi ve değerli fikirleri ile doktora sürecime katkı sağlayan Farmakoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Levent Kabasakal'a,

Doktora yolculuğum boyunca çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, desteğini ve sabrını hiç esirgemeyen, akademik gelişimime kıymetli katkılar sunan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Nur Yavuz'a, akademik gelişimimde büyük katkıları olan ve ufkumu açıp farklı bakış açıları sunan, desteğini her zaman hissettiğim değerli Dr. Öğr. Üyesi Büşra Ertaş'a, bu yolculukta bana eşlik eden iyi ki yollarımız kesişmiş dediğimiz ve her anımda desteğini hissettiğim, çalışmalarımda madden ve manen yanımda olan çok kıymetli arkadaşım Arş.Gör. Elif Beyzanur Polat'a,

Tez çalışmalarımı TDK-2022-10415 numaralı proje kodu ile destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne

Bu dünyadaki vazifelerimizin bilinciyle beni ve kardeşlerimi yetiştiren, okumamız için çokça fedakarlık göstererek başta insanlığa fayda bilinciyle bizleri meslek sahibi yapmak için çırpınan, bu süreçte tüm sıkıntılarımda destek ve dualarını benden esirgemeyen canım babam Bülent ve canım annem Ayşegül Kiyak'a, kendileri sayesinde en sevdiğim kimliklerden birisi olan ablalık vasfını en güzel şekilde hissettiğim ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim, büyüdükçe sevgimin daha da arttığı canım kardeşlerim Musab ve Üsame Kiyak'a,

Doktora sürecimde hayatıma giren, hayatı daha anlaşılır ve kolay kılan, varlığı ile her zaman bana destek olan sevgili eşim Muhammed Burak Kırmacı'ya ve ailesine,

Bana bu süreci en güzel bir öğreti olacak şekilde sunan Rabbime,

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ i
TABLO LİSTESİ..... iv
ŞEKİL LİSTESİ v
1. ÖZET 1
2. SUMMARY 2
3. GİRİŞ ve AMAÇ..... 3
4. GENEL BİLGİLER 5
4.1. Diyabetes Mellitus..... 5
4.1.1. Diyabetes Mellitus'un tanı yöntemleri……7
4.1.2. Diyabetes Mellitus'un klinik sınıflandırılması ve patogenezi…….8
4.1.3. Diyabetes Mellitus'un komplikasyonları……...……10
4.1.3.1. Mikrovasküler komplikasyonlar……11
4.1.3.2. Makrovasküler komplikasyonlar……12
4.1.4 Diyabetes Mellitus hayvan modelleri……13
4.1.4.1. Streptozotosin/Nikotinamid indüklü Tip 2 Diyabetes Mellitus modeli……..14
4.1.5. Tip 2 Diyabetes Mellitus tedavisi……..16
4.1.5.1. Diyabetes Mellitus tedavisinde yeni gelişmeler……..18
4.2. Sodyum Glukoz Ortak Taşıyıcı-2 İnhibıtörleri……..22
4.2.1. Empagliflozin……25
4.2.2. Dapagliflozin……..25
4.3. microRNA……..26
4.3.1. Tip 2 Diyabetes Mellitus ve miRNA arasındaki ilişki…..……..28
4.3.2. Kalp dokusu ve miRNA ilişkisi……30
4.3.3. Tip 2 Diyabetes Mellitus'ta kalp dokusunda miRNA'lara neler oluyor?.....31
5. GEREÇ ve YÖNTEM……35
5.1. Gereç……..35
5.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler……..……..35
5.1.2. Kullanılan cihazlar……..35
5.1.3. Kullanılan kitler……..36
5.1.4. Diğer malzemeler……36
5.2. Yöntem……36

5.2.1. Deneyde kullanılan hayvanlar…….36
5.2.2. Deney gruplarının oluşturulması ve modelin indüksiyonu…….37
5.2.3. Kan glukoz düzeylerinin takibi……...39
5.2.4. Hayvanların vücut ağırlıklarının ölçülmesi…….39
5.2.5. Oral glukoz tolerans testi (OGTT)……..39
5.2.6. İnsülin tolerans testi (İTT)……..40
5.2.7. Deney hayvanlarının sakrifiye edilmesi ve örneklerin alınması…….40
5.2.8 Torasik aortada izole organ banyosu çalışması……40
5.2.9. ELİSA analizlerinin yapılması……41
5.2.10. miRNA gen ekspresyon analizi……43
5.2.10.1. Total RNA izolasyonu……43
5.2.10.2. cDNA sentezi ve Real Time PCR analizi……..43
5.2.11. Histopatolojik analiz……..46
5.2.12. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi……..46
6. BULGULAR……...47
6.1. Kan Glukoz Düzeyi ve Vücut Ağırlıklarının Takibi…….…47
6.2. OGTT ve İTT Analizlerinin Sonuçları……...49
6.3. Torasik Aortada İzole Organ Banyosu Çalışmasının Sonuçları…….51
6.4. ELİSA Analizlerinin Sonuçları……...53
6.5. miRNA Analizlerinin Sonuçları…….57
6.6. Histopatolojik Analizler……..61
7. TARTIŞMA ve SONUÇ…….....65
8. KAYNAKLAR……78
9. ÖZGEÇMİŞ……90
10. BİLİMSEL FAALİYETLER……...91
11. EKLER……...92

KISALTMALAR LİSTESİ

AACE	:	Amerikan Klinik Endokronologlar Birliği
ACE	:	Anjiotensin dönüştürücü enzim
ADA	:	Amerikan Diyabet Birliği
AKG	:	Açlık kan glukozu
ARB	:	Anjiotensin reseptör blokörleri
ATP	:	Adenozin trifosfat
BCL-2	:	B hücreli lenfoma 2
Cav-3	:	Kaveolin-3
DAPA	:	Dapagliflozin
DM	:	Diyabetes Mellitus
DPP-4	:	Dipeptidil peptidaz-4
ELAVL1	:	ELAV benzeri protein 1
EMA	:	Avrupa İlaç Ajansı
EMPA	:	Empagliflozin
FDA	:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF-2	:	Fibroblast büyüme faktörü-2
GDM	:	Gestasyonel Diyabetes Mellitus
GİP	:	Gastrointestinal peptid
GLP-1	:	Glukagon benzeri peptid-1
GLUT2	:	Glukoz taşıyıcı-2
GLUT4	:	Glukoz taşıyıcı-4
GPx	:	Glutatyon peroksidaz
HbA1c	:	Glikozillenmiş hemoglobin
HFD	:	Yüksek yağlı diyet
HOMA-β	:	Homeostatik model değerlendirmesi-β
i.p.	:	İntraperitoneal

i.v.	:	İntraventriküler
İGÜ	:	İleri glikasyon son ürünleri
İGÜR	:	İleri glikasyon son ürünleri reseptörü
IL-1β	:	İnterlökin-1β
İR	:	İnsülin direnci
KAH	:	Koroner arter hastalığı
KAT	:	Katalaz
kTnI	:	Kardiyak troponin I
KVH	:	Kardiyovasküler hastalık
KVO	:	Kardiyovasküler olay
KY	:	Kalp yetmezliği
lncRNA	:	Uzun kodlanmayan RNA
MDA	:	Malondialdehit
MEF2A	:	Miyosit artırıcı faktör 2A
MEF2C	:	Miyosit artırıcı faktör 2C
miRNA	:	microRNA
NA	:	Nikotinamid
NAD+	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NOX	:	NADPH oksidazlar
Nrf2	:	Nükleer faktör eritroit 2 ilişkili faktör 2
PAH	:	Periferik arter hastalığı
PARP-1	:	Poli-ADP-riboz-polimeraz-1
PI3K	:	Fosfotidilinositol-3-kinaz
PPARγ	:	Peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör-γ
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SBP	:	Sistolik kan basıncı

SGLT2	:	Sodyum-glukoz ortak-taşıyıcı-2
SIRT1	:	Sirtuin-1 geni
SOD	:	Süperoksit dismutaz
STAT-3	:	Sinyal transdüktör ve transkripsiyon aktivatörü 3
STZ	:	Streptozotosin
T1DM	:	Tip 1 Diyabetes Mellitus
T2DM	:	Tip 2 Diyabetes Mellitus
YG	:	Yüksek glukoz
ZDF	:	Zucker Diabetic Fatty
α-SMA	:	α düz kas aktin

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1. Diyabetes Mellitus araştırma ve geliştirme sürecinin kısa tarihi……....6

Tablo 2. Prediyabet ve Tip 2 Diyabetes Mellitus referans değerleri……7

Tablo 3. Oral antidiyabetik ilaçlar……. 17

Tablo 4. Besinle uyarılan hormonlarla ilgili Tip 2 Diyabetes Mellitus (faz 2 denemeleri) ve Tip 2 Diyabetes Mellitus olan obez (faz 3 denemeleri) bireyler için klinik denemeler…….20

Tablo 5. Sodyum Glukoz Ortak Taşıyıcı inhibitörlerinin farmakokinetik özelliklerinin karşılaştırılması ……23

Tablo 6. *İn vivo* çalışma grupları……38

Tablo 7. Seçilen miRNA'lar ve primer dizileri……..45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. Streptozotosin kullanılarak oluşturulan Diyabetes Mellitus modelleri……...15

Şekil 2. Nikotinamid ve Streptozotosinin etki mekanizması ……..……16

Şekil 3. Sodyum Glukoz Ortak Taşıyıcı-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler yararı ile ilişkili şema…….....24

Şekil 4. microRNA'nın biyogenezi…….…….27

Şekil 5. Deney gruplarının oluşturulması ve sıçanların numaralandırılması……...37

Şekil 6. Çalışmanın tasarımı…….39

Şekil 7. İzole organ banyosuna asılmış torasik aorta görüntüsü……..42

Şekil 8. ELİSA analizleri sırasında kuyucukların görüntüsü……...43

Şekil 9. Total RNA izolasyonu esnasında kullanılan cihazlar…….44

Şekil 10 Tüm gruplarda haftalık kan glukoz düzeylerinin değerlendirilmesi……..47

Şekil 11. Tüm gruplarda haftalık vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi……..48

Şekil 12. Tüm gruplarda a) kalp ağırlığının değerlendirilmesi, b) %kalp ağırlığı/vücut ağırlığının değerlendirilmesi…….……..49

Şekil 13. Tüm gruplarda OGTT sonuçlarının değerlendirilmesi…….……..…50

Şekil 14. Tüm gruplarda İTT sonuçlarının değerlendirilmesi……51

Şekil 15. Tüm gruplarda torasik aortada izole organ banyosu sonuçlarının değerlendirilmesi…….52

Şekil 16. Tüm gruplarda serum örneklerinde a) IL-1β, b) SOD, c) kTnI ve d) İGÜR seviyelerinin ELİSA analizleri ile değerlendirilmesi……..54

Şekil 17. Tüm gruplarda kalp dokusunda a) IL-1β, b) SOD, c) kTnI ve d) İGÜR seviyelerinin ELİSA analizleri ile değerlendirilmesi.…….56

Şekil 18. Tüm gruplarda kalp dokusunda a) miR-144, b) miR-221, c) miR-373, d) miR-9, e) miR-223, f) miR-133a, g) miR-34a, ğ) miR-22, h) miR-21, ı) miR-146a ekspresyonlarının RT-PCR analizi ile değerlendirilmesi……59

Şekil 19. Hem çapraz (sol taraf) hem de uzunlamasına (sağ taraf) kesitleri gösteren kalp dokularının açıklayıcı mikrografları……62

Şekil 20. Torasik aort dokularının açıklayıcı mikrografları……...64

1. ÖZET

Tezin başlığı : Sodyum Glukoz Ortak Taşıyıcı İnhibitörlerinin Tip 2 Diyabetes Mellitus Oluşturulmuş Sıçanların Kalp Dokusundaki microRNA'lar Üzerine Etkilerinin İncelenmesi
Öğrencinin Adı Soyadı : Hümeysa Kiyak Kırmacı
Danışmanın Adı Soyadı : Prof. Dr. Hatice Kübra Elçioğlu
Programın Adı : Farmakoloji Doktora Programı

Amaç: Diabetes Mellitus (DM), son yıllarda küresel bir sorun haline gelmiş ve beraberinde gelişen komplikasyonlarla birlikte önemi her geçen gün daha da artmıştır. Tip 2 DM (T2DM) tedavisinde kullanılan Empagliflozin (EMPA) ve Dapagliflozin (DAPA), böbreklerden glukozun geri emilimini inhibe ederek kan glukozunu düşürmekte ve klinikte oldukça yaygın olarak kalple ilişkili durumlarda DM olmaksızın bile kullanılmaktadır. Ayrıca bu ilaçlar kardiyovasküler olay riskini ve buna bağlı mortaliteyi de azaltır. Bu çalışmada, nikotinamid/streptozotosin ile indüklenen T2DM sıçanların kalp dokusunda EMPA ve DAPA'nın farklı miRNA ekspresyonları üzerindeki etkilerinin araştırılarak etki mekanizmalarıyla ilişkili farklı yolakların aydınlatılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 3-4 aylık Sprague-Dawley sıçanlar (dişi/erkek) dört gruba ayrılmıştır; Kontrol, T2DM, EMPA ve DAPA. Sıçanların vücut ağırlıkları ve kan glukoz değerleri haftalık olarak ölçülmüştür. Serum ve kalp dokusunda interlökin-1β (IL-1β), süperoksit dismutaz (SOD), ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (İGÜR) ve kardiyak troponin I (kTnI) düzeyleri ELİSA analizleri ile incelenmiştir. RT-PCR, diyabetik sıçanların kalp dokusundaki miR-223, miR-373, miR-22, miR-9, miR-146a, miR-21, miR-144, miR-221, miR-133a ve miR-34a olmak üzere on farklı miRNA'nın ekspresyon seviyelerini analiz etmek için kullanılmıştır.

Bulgular: EMPA ve DAPA tedavilerinin inflamasyonda ve histopatolojik incelemelerde iyileşme sağladığı bulunmuştur. miRNA ekspresyonları incelendiğinde miR-223, miR-373, miR-22, miR-9, miR-146a, miR-21, miR-144, miR-221 ve miR-34a ekspresyonları Kontrol grubunda anlamlı derecede yüksektir. Ayrıca miR-146a ve miR-34a düzeyleri EMPA grubunda T2DM grubuna kıyasla yüksek iken miR-146a ekspresyonunun DAPA grubunda T2DM grubuna kıyasla artışı istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür.

Sonuç: EMPA ve DAPA kalpte miRNA ekspresyonlarını düzenleyici etkiye sahiptir ve kalpteki koruyucu etkilerine dair ekspresyon farklılıkları bulunan miRNA ile ilişkili genler üzerinde daha detaylı çalışılma yapılmasının gerekliliği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Tip 2 DM, miRNA, SGLT2i, streptozotosin-nikotinamid, kalp dokusu

2. SUMMARY

Title of Thesis: Investigation of the Effects of Sodium Glucose Co-Transporter Inhibitors on MicroRNAs in Heart Tissue of Type 2 Diabetes Mellitus Induced Rats
Student Name, Surname: Hümeysa Kiyak Kırmacı
Supervisor Name : Prof. Hatice Kübra Elçioğlu
Program Name : Pharmacology PhD Program

Objective: Diabetes Mellitus (DM) has become a global problem in recent years and its importance has increased day by day with its accompanying complications. Empagliflozin (EMPA) and Dapagliflozin (DAPA), used in the treatment of Type 2 DM (T2DM), reduce blood glucose by inhibiting the reabsorption of glucose from the kidneys and are widely used clinically in heart-related conditions without DM. In addition, these drugs reduce the risk of cardiovascular events and related mortality. This study aimed to shed light on the pathway differences related to their mechanisms of action by investigating the effects of EMPA and DAPA on different miRNA expressions in the heart tissue of T2DM rats induced by nicotinamide/streptozotocin.

Materials and Methods: Sprague-Dawley rats (female/male) of 3-4 months of age are divided into four groups; Control, T2DM, EMPA, and DAPA. The body weights and blood glucose values of the rats were measured weekly. The interleukine-1β (IL-1β), superoxide dismutase (SOD), receptor for advanced glycation end-products (RAGE), and cardiac troponin I (cTnI) levels in serum and heart tissue were examined by ELİSA analyses. RT-PCR was used to analyze the expression levels of ten different miRNAs including miR-223, miR-373, miR-22, miR-9, miR-146a, miR-21, miR-144, miR-221, miR-133a and miR-34a in the heart tissue of diabetic rats.

Results: EMPA and DAPA treatments were found to provide improvement in inflammation and histopathological examinations. When miRNA expressions are examined, miR-223, miR-373, miR-22, miR-9, miR-146a, miR-21, miR-144, miR-221, and miR-34a expressions are significantly higher in the control group. In addition, while miR-146a and miR-34a levels are higher in the EMPA group compared to the T2DM group, the increase in miR-146a expression in the DAPA group compared to the T2DM group is statistically significant.

Conclusion: EMPA and DAPA have a regulatory effect on miRNA expressions in the heart, and miRNA-related genes with expression differences regarding their protective effects in the heart should be studied in more detail.

Keywords: Type 2 DM, miRNA, SGLT2i, streptozotocin-nicotinamide, heart tissue

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM), dünya çapında 400 milyondan fazla insanı etkileyen ve halk sağlığını tehdit eden çok faktörlü ve ilerleyici bir hastalıktır (Slieker ve ark., 2023). T2DM'nin ayırt edici özelliği olan kalıcı hiperglisemi insülinin yetersiz üretilmesiyle veya insüline gelişen direnç nedeniyle insülinin reseptör sonrası olaylarında gelişen bozukluklara bağlı olarak meydana gelir (Xu ve ark., 2022). Kronik hiperglisemi, artan inflamasyona ve endotel disfonksiyonuna neden olan metabolik bozukluklara yol açar (Wieczór ve ark., 2019). Metabolik bozukluklar sonucunda mikro ve makrovasküler damarlar olumsuz etkilenir. Damar organizasyonundaki yapısal ve fonksiyonel anormalliklere bağlı olarak mikrovasküler (retinopati, nöropati ve nefropati gibi) ve makrovasküler (koroner kalp hastalıkları, kardiyomiyopati, periferik arter hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve alt ekstremite amputasyonları gibi) komplikasyonlar meydana gelir (Banday ve ark., 2020). T2DM'li kişilerde kronik hiperglisemiye bağlı olarak meydana gelen endotel fonksiyondaki bozulmalar sonucunda kardiyovasküler olaylar ve bunlara bağlı ölüm riski artmaktadır (Ma ve ark., 2022). Bu nedenle T2DM'li kişilerde sodyum-glukoz ortak taşıyıcı 2 (SGLT2) inhibitörlerinin kullanımı, ilaçların hem antidiyabetik hem de kardiyoprotektif etkileri nedeniyle oldukça tercih edilmekte ve kullanımları gittikçe artmaktadır (Shao ve ark., 2019). SGLT2 inhibitörleri, insülinden bağımsız bir şekilde proksimal tübülden renal glukoz geri emilimini inhibe eden oral anti-diyabetik ilaçlardır. Metformin kullanmayan T2DM hastalarında, kardiyovasküler olaylar geliştiğinde mortaliteyi azaltıcı etkileri olan ana ilaç olarak SGLT2 inhibitörlerinin tercih edildikleri bildirilmiştir (Kräker ve ark., 2020).

SGLT2 inhibitörlerinden empagliflozin (EMPA) ve dapagliflozin (DAPA), kilo kaybı sağlar, kan basıncını düşürür, kardiyovasküler mortaliteyi ve hastaneye yatışları azaltır (Ma ve ark., 2022). EMPA ayrıca T2DM olmayan kişilerde kalp yetmezliği (KY) ve kronik böbrek hastalığı endikasyonlarında da kullanılmaktadır. Bununla birlikte, DAPA'nın da kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkilerine ilişkin birçok klinik çalışma bulunmaktadır (Zhu ve ark., 2022). DAPA, T2DM'nin yanı sıra koroner arter hastalığında tüm nedenlere bağlı mortaliteyi ve kardiyovasküler ölümü azaltmaktadır. Tüm bu bilgilere rağmen bu ilaçların klinik kullanımları olsa da kardiyovasküler olaylar üzerindeki olumlu etkilerinin mekanizması hala aydınlatılamamıştır (Bellido ve ark., 2022). Kalpte SGLT2 ekspresyonu olmadığından, SGLT2

inhibitörlerinin etkilerini reseptörden bağımsız olarak gösterdiği düşünülmektedir (Kräker ve ark., 2020). Bu ilaçların, kalpte inflamasyonu, oksidatif stresi ve hatta mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu glisemik kontrolden bağımsız bir mekanizma ile inhibe ederek kalpte koruyucu etki gösterdiğine dair hipotezler vardır. Dolayısıyla EMPA ve DAPA'nın T2DM'li hastalarda kalp fonksiyonları üzerindeki faydalı etkilerinin mekanizması ve karşılaştırılması hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Escobar ve ark., 2023; Shao ve ark., 2019). Bu nedenle kardiyovasküler açıdan değerlendirildiğinde ortaya çıkan çelişkiler, iki ilacın etki mekanizmasının ve arasındaki etki farkının anlaşılması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Memon ve ark., 2022).

Diyabetes Mellitus (DM) hastalarında komplikasyonlar her zaman semptom göstererek ilerlemez. DM'li hastalarda kardiyak fonksiyon değişiklikleri asemptomatik olarak ortaya çıkabilir (Copier ve ark., 2017). Bu nedenle araştırmacılar, DM komplikasyonlarının erken tespiti için yüksek verimli tarama sağlayan mikroRNA'lar (miRNA'lar) gibi biyobelirteçlere yönelmiştir (Massaro ve ark., 2019). miRNA'lar gen ifadelerini düzenleyerek proliferasyon, apoptoz, inflamasyon gibi birçok biyolojik sürece dahil olurlar. miRNA ifadesindeki değişiklikler, bağlantılı sinyal yolunun patogenez veya tedavideki işlevi için çok önemlidir. miRNA'lar DM'ye bağlı kardiyovasküler olaylarda ekspresyonlarındaki değişiklerle yeni bir hedef olarak dikkat çekmektedir (Copier ve ark., 2017; Mascolo ve ark., 2022). Ancak bazı miRNA'ların T2DM'li kalp dokusu üzerindeki etkileri hala belirsizdir.

Tüm bu bilgiler ışığında EMPA ve DAPA'nın T2DM'li kalp dokusu üzerinde yararlı etkileri vardır, ancak bu yararlı etkilerin mekanizması ve bu iki ilacın T2DM'yi tedavi ederken glukozdan bağımsız olarak kalpte nasıl koruyucu etki gösterdiği bir soru işaretidir. Aynı zamanda güncel olarak hastalıkların teşhisi, patogenezi ve tedavisinde önem kazanmış olan ve T2DM'li kalpte ekspresyonlarının değiştiği bilinen miRNA'lara olan etkileri de bilinmemektedir. Bu verilerin eksikliği nedeniyle çalışmadaki amacımız, EMPA ve DAPA ile tedavi edilen streptozotosin (STZ)-nikotinamid (NA) indüklü T2DM sıçanların kalp dokusunda seçilen miRNA ekspresyonlarının değişikliklerini RT-PCR ile, kalp dokusunda ve serumda SOD, kTI, RAGE, IL-1β seviyelerini ELİSA ile ve; kalp dokusundaki hasarı histopatolojik analizler ile değerlendirmektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Diyabetes Mellitus

Diyabetes Mellitus (DM), dünya çapında 400 milyondan fazla insanı etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur. DM, insülin sekresyonundaki eksiklikten, pankreas β-hücresinin hasar görmesinden veya insülinin kullanılamamasına bağlı insülin direncinden (İR) kaynaklanır (Slieker ve ark., 2023). İR, metabolik değişikliklerin ve endotel disfonksiyonunun gelişiminde anahtar bir faktördür (Zhao ve ark., 2023). İR, hipertansiyon, santral obezite ve aterojenik dislipidemi gibi bir dizi metabolik anormallik olarak tanımlanan metabolik sendromun gelişiminde önemli bir rol oynar (Kosmas ve ark., 2023). Fizyolojik koşullar altında, insülin salgılanması ve doku insülin duyarlılığının sağlıklı olduğu durumlarda açlık kan glukozu (AKG) seviyeleri 3.9-6.1 mM olmalıdır. Genetik kalıtım, viral enfeksiyon, sağlıksız yaşam tarzı, diğer fiziksel ve/veya kimyasal hasarlar gibi çeşitli faktörler, β-hücre tahribatına, bozulmuş insülin sekresyonuna ve periferik doku insülin duyarlılığının kaybına yol açarak yüksek kan glukoz düzeylerine neden olur (Y. Sun ve ark., 2021). DM, kan glukoz düzeylerinin sürekli anormal yükseklikte seyri sonucunda meydana gelen hiperglisemi ile karakterize metabolik bir bozukluktur ve basitçe diyabet olarak da bilinmektedir. Hiperglisemi insülinin sekresyonunda veya insülinin etkisinde meydana gelen bozukluklar veya her ikisinin birden bozulması sonucunda meydana gelerek karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında da bozulmalara neden olur. Bu da normal glukoz seviyelerini korumaya yönelik hiperinsülinemi ile sonuçlanır. DM vücutta ilerleyici ve kompleks bir patogeneze sahiptir ve birçok metabolik bozuklukla karşımıza çıkar (Banday ve ark., 2020; Zhao ve ark., 2023). DM hastalığının tarihi öyküsüyle ilgili kısa bilgiler Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 1. Diyabetes Mellitus araştırma ve geliştirme sürecinin kısa tarihi (Sakran ve ark., 2022'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Tarih	**Gelişme**
-	Diyet varyasyonları
550 Ortak Çağda	Kanama, kusturucular ve narkotikler
1921	İnsülinin keşfi
1923	Ticari hayvan insülinin uygunluğu bulunmuştur.
1936	Uzun etkili insülinin tanımlanmıştır.
1941	Şeker varlığının tespiti için idrar test tabletleri geliştirilmiştir.
1949	İnsülin uygulaması için şırıngalar bulunmuştur.
1961	Hipoglisemi için glukagonun uygunluğu bulunmuştur.
1971	İlk kan glukozu ölçüm cihazı geliştirildi.
1972	Metformin, Kanada'da kullanım için onaylandı.
1983	Rekombinant insülin geliştirildi.
1995	İlk Alfa-Glukozidaz İnhibitörü olan akarboz FDA tarafından onaylanmıştır.
1996	İlk tiazolidindion türevi olan troglitazon Amerika'da piyasaya çıkmıştır.
1997	İlk Meglitinid olan repaglinid FDA tarafından onaylanmıştır.
2005	İlk Amilin agonisti- Pramlintid FDA tarafından onaylanmıştır. İlk Glukagon Benzeri Peptid-1(GLP-1) reseptörü agonisti olan exenatide klinik kullanıma sunulmuştur.
2006	İlk Dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörü sitagliptin FDA tarafından onaylanmıştır.
2008	Colesevelam T2DM için FDA tarafından onaylanmıştır.
2009	Bromokriptin Amerika'da kullanım için onaylanmıştır.
2013	İlk Sodyum Glukoz Taşıyıcı-2 (SGLT2) inhibitörü kanagliflozin FDA tarafından onaylanmıştır.

4.1.1. Diyabetes Mellitus'un tanı yöntemleri

DM için sıklıkla kullanılan tanı yöntemleri arasında ön tarama için aç karnına veya rastgele kan glukoz düzeyi ölçümü, homeostatik model değerlendirmesi -IR (HOMA-IR), oral glukoz tolerans testi (OGTT), periferik dokuların duyarlılığını tespit etmek için intraperitoneal glukoz tolerans testi, β hücrelerinin fonksiyonunu belirlemek için glukoz ve insülin, serum insülin seviyesi, homeostatik model değerlendirmesi-β (HOMA-β) ve insülin salınım testleri ve önceki 8-12 hafta boyunca kan glukoz seviyesini göstermek için glikolize hemoglobin (HbA1c) testleri yer alır (Min ve ark., 2023; World Health Organization, 2016). Klasik DM tanı yöntemleri ve referans aralıkları kısaca Tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 2. Prediyabet ve Tip 2 Diyabetes Mellitus referans değerleri (Ortiz-Martinez ve ark., 2022'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

	AKG	**HbA1c**	**OGTT, 2 s**
Prediyabet ADA WHO	 100–125 mg/dL 110–125 mg/dL	 5.7–6.4% Tavsiye edilmez.	 140–199 mg/dL
Diyabetes Mellitus ADA WHO	 ≥ 126 mg/dL	 ≥ 6.5%	 ≥ 200 mg/dL

AKG: açlık kan glukozu; HbA1c: glikozile hemoglobin A1c; OGTT: oral glukoz tolerans test; ADA, Amerikan Diabet Birliği; WHO: Dünya Sağlık Örgütü.

Ancak AKG, OGTT ve HbA1c her zaman mükemmel şekilde uyumlu olmayabilir. Bu durum kısmen glukoz metabolizmasının farklı fizyolojik aşamalarının ölçülmesiyle açıklanabilir; aynı şey HbA1c ve glukoz bazlı testler arasında da meydana gelir. OGTT ve HbA1c testleri orta ve düşük gelirli ülkelerde zaman ve maliyet kısıtlamaları nedeniyle rutin olarak yapılmamaktadır. Bu nedenle bazı ülkelerde AKG, T2DM'nin taranması, tanısı ve izlenmesi için hala önemini korumaktadır (Ortiz-Martínez ve ark., 2022).

Yine de tüm bunlara ek olarak güncel çalışmalar erken teşhise yönelerek hastalığın erken dönemde teşhisine ve böylece hastalığın ilerlemesinin önlenmesine odaklanmıştır. Çünkü erken teşhise yönelik tanı yöntemlerinin olmayışı, hastaların tedaviye erken başlama fırsatını kaybetmesine yol açmaktadır (Yaoxiang Sun ve ark., 2021). Ayrıca kalp krizi, görme kaybı,

böbrek fonksiyon bozuklukları ve dirençli yara iyileşmesi sıklıkla DM tanısından önce ortaya çıkar ve bu semptomlar ciddi organ hasarına işaret eder. Bu nedenle DM ve DM komplikasyonlarının erken tespiti çok önemlidir; ancak kesin bir erken teşhis yöntemi mevcut değildir (World Health Organization, 2016.).

Mevcut tedavi stratejileri hastalığı ve komplikasyonlarını iyileştirmek yerine yalnızca geçici glisemik kontrol sağlar. Eksozomlar, bireysel fizyolojik durumu yansıtan, metabolizmayı düzenleyen ve hasarlı dokuları onaran biyoaktif moleküller içeren nanopartiküllerdir. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının biyobelirteçleri olarak rol alma potansiyeline sahiptir (Yaoxiang Sun ve ark., 2021). Hastalık tanısı ve erken teşhisnde hücreler üzerinde etkili olan miRNA, uzun kodlanmayan RNA (lncRNA), protein vb. moleküler düzeyde yapıları taşıması dolayısıyla bireysel ve son derece güncel bir yöntem olarak yakın zamanda tartışılmaya başlanmıştır (Pegtel ve Gould, 2019; Yaoxiang Sun ve ark., 2021).

Bir diğer yaklaşım klasik belirteçlerin prognoz değerini iyileştirmektir. Yakın zamanda çalışılmaya başlanan glisemik belirteçler arasında glikozillenmiş albümin, fruktozamin ve 1,5-anhidroglusitol gibi biyobelirteçler yer almaktadır. Bu belirteçlerin performansını karşılaştıran çalışmalardan elde edilen veriler bunların bağımsız klinik bilgi sağladıklarını ve klasik belirteçlerin prognostik değerini iyileştirebileceklerini göstermiştir (Ortiz-Martínez ve ark., 2022).

4.1.2. Diyabetes Mellitus'un klinik sınıflandırılması ve patogenezi

DM'nin patofizyolojisi ve tanımı oldukça komplekstir. Son yıllarda yapılan keşiflerle daha da karmaşık hale gelmektedir. Genel olarak, DM günümüzde elde edilen veriler ışığında aşağıdaki ana başlıklar altında sınıflandırılmaktadır:

- Tip 1 DM (T1DM); DM vakalarının %5-10'unu oluşturan T1DM insüline bağımlı diyabet olarak da bilinir ve genç yaşta başlayan DM'dir. Genellikle susama, kilo kaybı ve poliüri gibi semptomlarla kendini gösterir. Pankreas β-hücrelerinin T hücreler aracılığıyla yıkımı sonucunda insülin eksikliği ve nihayetinde hiperglisemi ile sonuçlanan mutlak insülin yetersizliği ile karakterize otoimmün bir hastalıktır.
- Tip 2 DM (T2DM); DM vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturan T2DM insulin direnci ve β-hücre disfonksiyonu olmak üzere iki temel anomali ile karakterizedir. İnsülin direnci çeşitli hücresel sinyalizasyonların bozulmasından kaynaklanır ve bunun sonucunda kas, karaciğer ve yağ dokusu gibi periferdeki dokularda hücrelerin insüline duyarlılığı veya yanıtı

azalır. Hastalığın erken döneminde azalan insulin duyarlılığı sonucunda kan glukoz seviyelerinin fizyolojik koşullarda kalmasını sağlamak amacıyla β-hücre fonksiyonlarının artması ile insulin salınımı artar. İnsülin salınımının artışı sonucu meydana gelen hiperinsülinemi hiperglisemiyi önlemeye çalışır ancak yine de bu durum insulin duyarlılığındaki azalmayı telafi edemez. β-hücre fonksiyonu aşırı çalışmaya bağlı olarak azalmaya başlar ve disfonksiyonu meydana gelerek insulin eksikliğine neden olur. Normoglisemi sürdürülemez ve böylece hiperglisemi oluşur. T2DM genellikle semptomatik değildir (Banday ve ark., 2020; Y. Sun ve ark., 2021).

- Gestasyonel DM (GDM); gebelik sırasında meydana gelen tüm DM vakaları ve komplikasyonlarının %90'dan fazlası GDM kaynaklıdır. Genellikle gebeliğin erken dönemlerinde hem açlık hem de tokluk kan glukozu normalden düşüktür ancak gebeliğin üçüncü trimesterinde kan glukoz seviyeleri yükselir ve kan glukozu diyabetik seviyelere ulaştığı zaman GDM adını alır. GDM insidansı tüm gebeliklerin %1 ila %14'ü arasında değişim göstermektedir ve prevalansı incelenen popülasyonların ırk veya etnik gruplarına göre oldukça değişiklik gösterir. GDM, gebeliğin başlangıcında veya gebelik sırasında, genellikle ikinci veya üçüncü trimesterde teşhis edilen herhangi bir derecede glukoz intoleransı veya DM olarak tanımlanmıştır (Banday ve ark., 2020).
- Diğer nedenlere bağlı spesifik DM türleri; monogenik DM sendromları (neonatal DM ve gençlerin olgunluk başlangıçlı DM'si [MODY]), ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibroz gibi) ve ilaç veya kimyasal kaynaklı DM (HIV/AIDS tedavisinde veya organ nakli sonrasında olduğu gibi) olarak sınıflandırılmıştır (Sakran ve ark., 2022).

T2DM prevelansını artıran risk faktörleri genetik, metabolik ve çevresel faktörlerdir ve birbirleri ile etkileşimleri oldukça komplekstir. Aile öyküsü, etnisite gibi değiştirilemeyen risk faktörlerine bağlı T2DM'ye yatkınlık güçlü bir genetik temele dayansa da epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler obezite, düşük fiziksel aktivite ve sağlıksız beslenme gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin iyileştirilmesi ile birçok T2DM vakasının önlenebileceğini gösterir (Galicia-Garcia ve ark., 2020).

T2DM'nin patofizyolojisi aşağıdaki yer alan mekanizmalardan bir tanesini veya bu mekanizmaların beraber şekilde seyretmesini içerir.

- ✓ Langerhans adacıklarının β hücrelerinden insülin salgılanmasının azalması,
- ✓ Langerhans adacıklarının α hücrelerinden glukagon salgılanmasının artışı,

- ✓ Karaciğerde glukoz üretminde artışın meydana gelmesi,
- ✓ Nörotransmitterlerin disfonksiyonu ve beyinde İR'nin gelişmesi,
- ✓ Lipoliz artışı,
- ✓ Böbreklerden glukoz geri emiliminin artması,
- ✓ İnce barsaklarda inkretin etkisinin azalması,
- ✓ İskelet kası, karaciğer ve adipoz doku gibi periferik dokular tarafından glukoz alımının azalması (Padhi ve ark., 2020).

4.1.3. Diyabetes Mellitus'un komplikasyonları

DM hücrelerin hemen hemen tüm metabolik yollarında önemli anormalliklere neden olur. Böylece birçok organ sisteminde çok sayıda patolojik durum meydana gelir. DM'nin kronik komplikasyonları genellikle insülin eksikliği veya İR'nin yanı sıra kalıcı hiperglisemi, dislipidemi ve diğer metabolik yollardaki bozukluklara bağlıdır. Ayrıca DM ve komplikasyonları önemli çevresel ve genetik bileşenleri içeren çok faktörlü karmaşık mekanizmaları da içermektedir. DM'nin bu komplikasyonları, hastalıkla ilişkili morbidite ve mortalitenin çoğundan sorumludur. Ayrıca DM ile ilgili toplumsal ve mali sorunlar da esas olarak bu komplikasyonların başlangıcı ve tedavisiyle ilişkilidir. Geleneksel sınıflandırmada uzun dönemde vücut boyunca küçük damarlarda ve büyük damarlarda meydana gelen komplikasyonlar sırasıyla mikrovasküler komplikasyonlar ve makrovasküler komplikasyonlar olarak adlandırılır. DM'nin kronik komplikasyonları, kardiyovasküler hastalığı (KVH) içeren makrovasküler komplikasyonlar veya retinopati (DR), nefropati (DN) ve nöropatiyi içeren mikrovasküler komplikasyonlar olarak sınıflandırılmıştır (Cole ve Florez, 2020; Feldman ve ark., 2019). Ancak son zamanlarda yayınlanan çalışmalara göre DM'nin sadece mikrovasküler veya makrovasküler kategorilere kolayca ve doğru bir şekilde yerleştirilemeyen birçok komplikasyonu olduğundan bu yapay sınıflandırmanın revize edilmesi gerektiği önerilmektedir. Örneğin nöropatinin hem mikrovasküler hem de nöronal/aksonal hücre fonksiyon bozukluklarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Feldman ve ark., 2019; Yu ve ark., 2024). DM komplikasyonlarının profili yalnızca vasküler doku kaynaklı olanlardan hem vasküler hem parankimal kaynaklıya kadar geniş bir profile sahiptir. Bu nedenle Yu ve arkadaşları DM komplikasyonlarını, vasküler, parankimal ve hibrid (hem vasküler hem de parankimal) doku kökenli DM komplikasyonları şeklinde sınıflandırılmasını önerir (Yu ve ark., 2024). Ancak bu sınıflandırmalar henüz yeni tartışılmaya başlandığı için bu tezde klasik komplikasyon sınıflandırması üzerinden konu işlenmeye devam edilmiştir.

4.1.3.1. Mikrovasküler komplikasyonlar

T2DM'li hastalar için mikrovasküler komplikasyonların önemli bir sorun olduğu belirtilmiştir (Aikaeli ve ark., 2022). Koroner ve serebrovasküler damarları içeren makrovasküler sistemin hiperglisemi kaynaklı hasarı DM'nin başta gelen ölüm nedenlerinden olsa da mikrovasküler komplikasyonlar olarak adlandırılan böbrek, gözler ve sinir uçları gibi mikrovasküler ağdaki hiperglisemi kaynaklı hasarlar da oldukça yaygındır ve mortalite oranı fazladır (Cole ve Florez, 2020). T2DM hastalarında mikrovasküler komplikasyonlar için risk faktörleri olarak çeşitli faktörler tanımlanmıştır. Bu faktörler arasında daha uzun DM süresi, hipertansiyon, dislipidemi, HbA1c seviyelerinin yüksekliği ve insülin kullanımı yer almaktadır (Bui ve ark., 2019; Mansour ve ark., 2023). Erken teşhis ve müdahale, komplikasyonları azaltmaya ve hasta sonuçlarını iyileştirmeye yardımcı olmaktadır (Bui ve ark., 2019). Mikrovasküler komplikasyonların erken tespiti T2DM tedavisinde çok önemlidir. Erken teşhis, hızlı müdahaleye olanak tanır, komplikasyonların ilerlemesini azaltır ve hastaların yaşamları üzerindeki etkilerini hafifletir. Yeni teşhis edilen T2DM hastalarında yapılan bir çalışmada, mikrovasküler komplikasyon prevalansının %12 olduğu tahmin edilmiştir (Aikaeli ve ark., 2022). Başka bir çalışmada yeni tanı alan T2DM hastalarında nöropati, nefropati ve retinopati prevalansının sırasıyla %68,5, %56,2 ve %31,4 olduğu rapor edilmiştir (Ali ve ark., 2013). Bu komplikasyonlar T2DM hastalarında önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (Aikaeli ve ark., 2022).

Retinopati: T2DM'nin sık görülen bir komplikasyonudur ve tedavi edilmezse görme kaybına neden olabilir. Yeni teşhis edilen T2DM hastalarında yapılan bir çalışmada retinopati prevalansı %31,4 olarak bulunmuştur (Ali ve ark., 2013). Diyabetik retinopati, gelişmiş dünyada çalışma çağındaki yetişkinlerde körlüğün en yaygın nedeni olmaya devam etmektedir (Theo ve ark., 2021). Retinopatinin patofizyolojisi zor anlaşılmaktadır ve hiperglisemi, oksidatif stres, inflamasyon ve vasküler fonksiyon bozukluğu dahil olmak üzere birçok mekanizmayı içerir. Görme kaybının önlenmesinde erken teşhis ve müdahale çok önemlidir. T2DM hastalarına tanı anından itibaren yıllık olarak retinopati taramasının yapılması gereklidir (Theo ve ark., 2021).

Nefropati: Ciddi böbrek hastalığına yol açabilir ve T2DM hastalarında önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Yeni tanı almış T2DM hastalarında yapılan bir çalışmada nefropati prevalansı %56,2 olarak bulunmuştur (Ortiz-Martinez ve ark., 2022). Nefropati

patofizyolojisinde hiperglisemi, oksidatif stres, inflamasyon ve vasküler disfonksiyon gibi çeşitli faktörler rol almaktadır (Raut ve ark., 2024). Nefropatinin önlenmesi ve yönetilmesinde erken teşhis ve müdahale çok önemlidir. Nefropati taraması T2DM hastalarında tanı anından itibaren yıllık olarak yapılmasıının gerekliliği belirtilmiştir (Raut ve ark., 2024).

Nöropati: Nöropati, T2DM hastalarında periferik sinirleri etkileyen yaygın bir mikrovasküler komplikasyondur. Yeni tanı alan T2DM hastalarında nöropati prevalansının bazı çalışmalarda %68,5 kadar yüksek olduğu bildirilmektedir (Ortiz-Martinez ve ark., 2022). Diyabetik nöropati, kardiyovasküler ve gastrointestinal sistem gibi çeşitli organ sistemlerinde nörolojik fonksiyon bozukluğuna neden olarak morbidite ve mortaliteye neden olabilir. Hiperglisemi sonucu gelişen diyabetik nöropatinin önemli bir mikrovasküler komplikasyon olduğu ileri sürülmüştür (Mansour ve ark., 2023). Diyabetik nöropatinin yönetimi semptom kontrolüne odaklanır ve uzun vadeli komplikasyonları önlemek için hastalığın ilerlemesinin yakından izlenmesi esastır (Mansour ve ark., 2023).

4.1.3.2. Makrovasküler komplikasyonlar

T2DM, dokuda İR ve göreceli insülin eksikliğinden kaynaklanan hiperglisemi ile karakterizedir. 2021 yılına ait tahminler, dünya çapında yaklaşık 537 milyon kişinin T2DM'ye sahip olduğunu göstermektedir. Bu rakamın 2045 yılına kadar %46 oranında artarak 783 milyona çıkması beklenmektedir. Tüm T2DM vakalarının yarısından fazlası (296 milyon) Batı Pasifik ve Güneydoğu Asya bölgelerinde meydana gelmektedir. Koroner arter hastalığı (KAH), serebrovasküler hastalıklar, KY ve periferik arter hastalığı (PAD) dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar (KVH'ler), T2DM hastalarında en sık görülen komplikasyonlar arasındadır ve T2DM olmayanlara göre iki ila dört kat daha sık görülmektedir. Mikrovasküler komplikasyonları olanlar da dahil olmak üzere T2DM'li hastalarda ateroskleroz daha hızlı gelişir ve bu durum sıklıkla KVH'lerin erken gelişmesine yol açar (Wong ve Sattar, 2023). DM'li kişilerde tüm ölümlerin %65'ine KVH neden olmaktadır. T2DM'li hastalarda KVH önde gelen ölüm nedenidir (%70). DM'li bireyler yaş, obezite, tütün kullanımı, dislipidemi ve hipertansiyon gibi risk faktörlerinin düzeltildiği durumlarda dahi DM'li olmayan bireylere kıyasla KVH için 4 kat daha fazla risk altındadır. Bu risk faktörleri DM'de yaygın olsa da veriler DM'nin KVH için bağımsız bir risk faktörü olduğunu da göstermektedir (Sakran ve ark., 2022).

DM'ye metabolik anormallikler, ventriküller yeniden şekillenme, oksidatif stres ve otofaji eşlik eder. İR ile karakterize olan T2DM, kalıcı hiperglisemi, İR, hipertansiyon ve oksidatif strese bağlı olarak kalp yapısını ve fonksiyonunu değiştirir. Serbest radikallerin artmasına bağlı olarak hücre hasarları, mitokondriyal disfonksiyonlar meydana gelir. Yüksek glukoz (YG) maruziyeti de mitokondri hasarına ve oksidatif stresin artmasına neden olur. YG seviyelerinin hücre canlılığını azaltabileceği; reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA) ve azalmış süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerini artırabileceği bilinmektedir (Jakubik ve ark., 2021; Tang ve ark., 2018). YG'ye maruz kalan kalp hücrelerinde hücre ölümü ve inflamasyon kaskadını başlatan olaylar da aktive olur. ROS üretimi ve süpürülmesi arasındaki dengenin bozulması sonucunda oksidatif stres meydana gelir ve sinyalleşmenin bozulması sonucunda kasılma kusurları, ileri glikasyon son ürünleri (İGÜ)'nin artışı ve kalsiyum dengesinin bozulması gibi birçok patolojiyi beraberinde getirir (Costantino ve ark., 2016; Jeyabal ve ark., 2016). Serbest radikallerin neden olduğu hasara ek olarak bir diğer yaklaşım kalp hücrelerinde hiperglisemiye bağlı yağ asitlerinin hücreye alımının artması olarak karşımıza çıkar. Hiperglisemi kaynaklı ortaya çıkan YG toksisitesi ve lipotoksisite KY gibi KVO'nun gelişmesine neden olur (Li ve ark., 2019). Dolayısyla İR, glukoz metabolizmasındaki değişiklikler, oksidatif stres, lipit homeostazisi, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, İGÜ reseptörlerinin (İGÜR) oluşumu, Ca^{2+}'un yanlış kullanımı, artan inflamasyon ve artan yağ asitleri tüketimi gibi çeşitli mekanizmalar kalbi etkiler. DM'de artan kan basıncı, İR ve oksidatif stres, hastalık ilerledikçe kalbin yeniden yapılanmasına neden olur. Hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) inhibitörleri, DPP-4 inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB) gibi adjuvan tedavi tercih edilir. Mevcut terapötik stratejilerin DM ile ilişkili kardiyovasküler komplikasyonların tedavisinde yeterli olmadığı bildirilmiştir (Bugga ve ark., 2022).

Ancak tedavi açısından bakıldığında son yıllarda T2DM ilacı olan SGLT2 inhibitörlerinin KY ve KVO riskini azalttığı gösterilmiştir ancak T2DM'li kalpteki koruyucu etkilerine dair mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır (Li ve ark., 2019).

4.1.4. Diyabetes Mellitus hayvan modelleri

DM'nin patogenezini anlamak için tam olarak karakterize edilmiş ve klinik olarak ilişkili hayvan modellerinin varlığı hayati role sahiptir. Bu modeller sayesinde hayvanlar genetik ve fonksiyonel olarak birleştirilmiş etki ile insanlarda direk ilaç araştırmalarının yerini alır. T2DM bozukluğunu daha iyi anlamak, patofizyolojisini ve komplikasyonlarını göstermek ve T2DM'yi

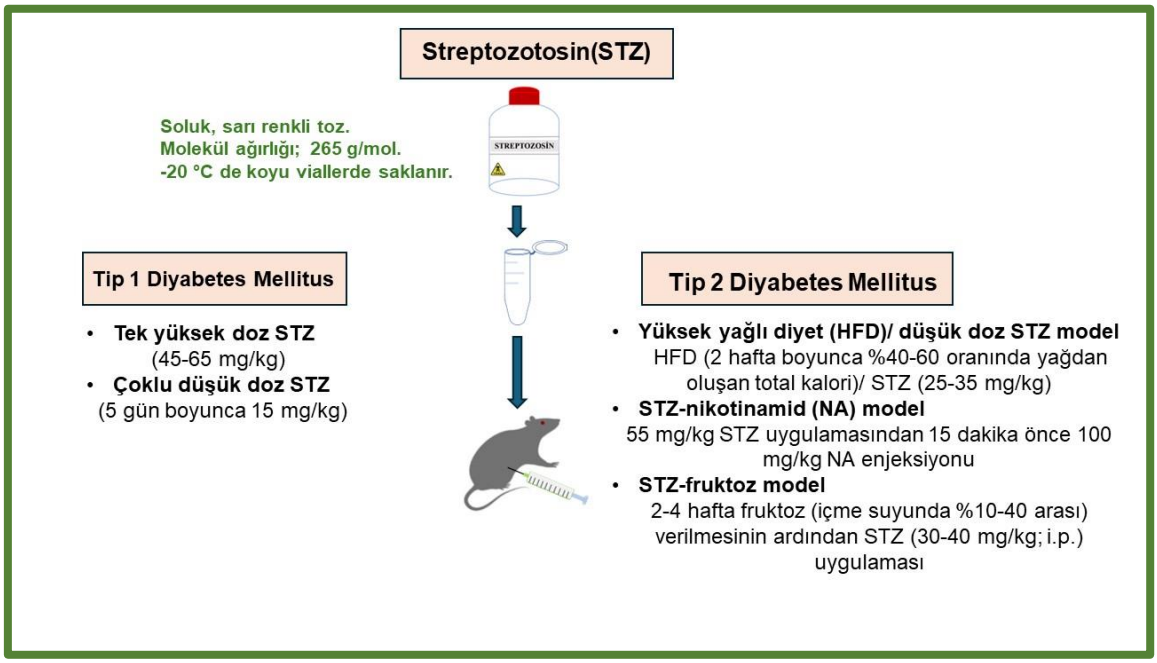
daha etkili ve daha iyi terapötiklerle tedavi etme amacına ulaşmak için birçok hayvan modeli geliştirilmiştir. Bu hayvan modellerinde indüklenen semptom kalıpları genellikle obezite, bozulmuş glukoz toleransı, İR ve obezitenin T2DM gelişimi ile yakından ilişkili olduğu insan durumunu yansıtan β-hücre modellerini içerir. Hem genetik olarak spontan hem de deneysel olarak indüklenen diyabet modelleri mevcuttur (Yang ve ark., 2020). DM modellerini deneysel olarak indüklemek için kimyasallar, viral ajanlar, insülin antikorları ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır (Rais ve ark., 2022). Sıçanlarda çalışmalarda kullanılan ve optimize edilmiş T2DM modelleri oldukça fazladır;

1. Monogenik modelde genellikle leptin sinyalizasyonu hasarlıdır (Leprdb/db faresi ve Zucker Diabetic Fatty (ZDF) sıçanı gibi).
2. Poligenik modelde obezite, glukoz intoleransı ve DM gibi çeşitli genotiplerin ve duyarlılıkların çalışılmasına olanak tanır (C57BL/6J fare suşu).
3. Kimyasal indüklü T2DM model İR'nin yanı sıra pankreasta β-hücre fonksiyonu ve kütlesindeki kusurlarla güçlü bir şekilde ilişkilidir. Böylece insülinin glukoz, lipid ve protein metabolizması üzerindeki kritik düzenleyici etkisini engelleyerek karakterize edilen hastalık oluşumunu hızlandırır.

Genetik olmayan modellerin en önemli avantajı araştırmacıların insanda yavaş gelişen T2DM patogenezine benzeyecek şekilde özelleştirebilmeleridir; bu süreç glukoz intoleransına, İR'ye, kompanse etmek için insülinin aşırı salınımına ve kısmi β-hücre ölümüne kadar devam eder (Fang ve ark., 2019). Kimyasal indüklü T2DM modelinin bir örneği de STZ/NA T2DM modelidir.

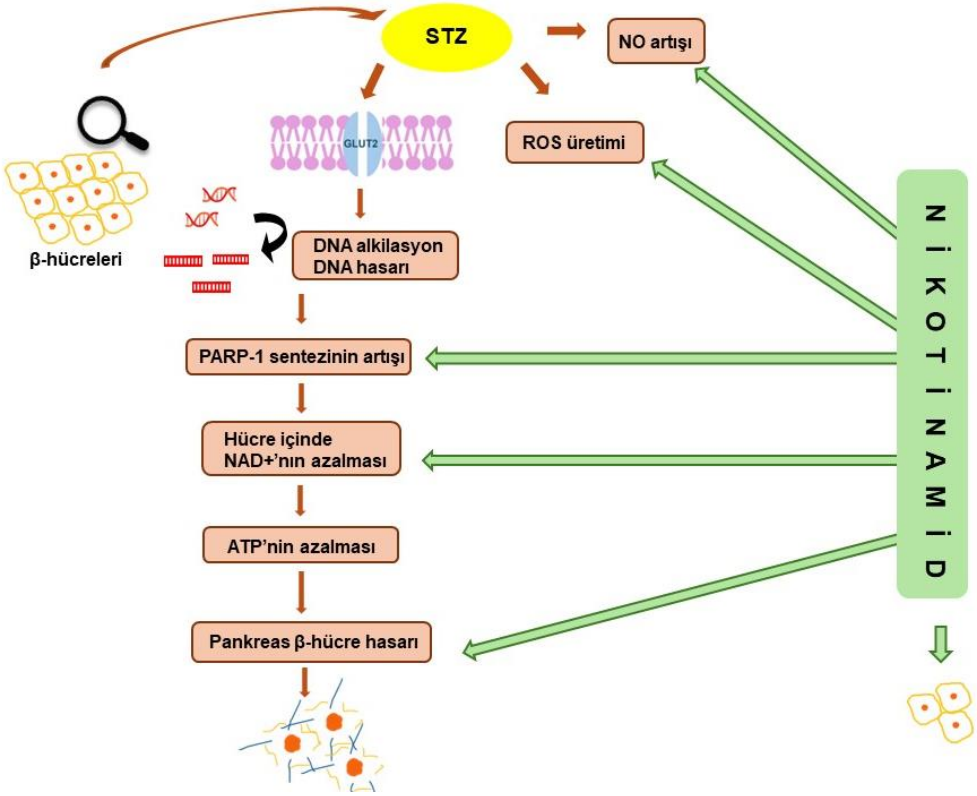
4.1.4.1. Streptozotosin/Nikotinamid indüklü Tip 2 Diyabetes Mellitus modeli

DM başlatmak için en çok tavsiye edilen ve hızlı metodlar STZ ve alloksan gibi kimyasallar kullanmaktır. STZ alloksana kıyasla daha iyi bir diyabetojenik ajandır. Alloksanın sadece T1DM'e neden olması, sıçanlarda yüksek ölüm oranına ve ketozise neden olması gibi birçok dezavantajı vardır. Ayrıca, β-hücrelerine karşı seçiciliği daha azdır ve meydana gelen DM'nin geri dönüşümü oldukça hızlıdır. STZ, hem tip 1 hem de tip 2 diyabeti indüklemek için kullanılabilir. STZ hayvanlarda hücre ölümüne yol açan genotoksik davranışını, DNA sarmal kırılmaları ile hücresel hasara neden olabilen glukoz taşıyıcı-2 (GLUT2) yoluyla pankreatik β-hücrelerinde nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD^+) indirgenmesi yoluyla gerçekleştirir.



Şekil 1. Streptozotosin kullanılarak oluşturulan Diyabetes Mellitus modelleri (Ghasemi A., ve Jeddi S. 2023'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

NA, NAD^+'nın biyokimyasal öncüsüdür ve bir poli-ADP-riboz-polimeraz-1 (PARP-1) inhibitörüdür. NAD^+, adenosin trifosfat (ATP) üretimi ve diğer birçok metabolik yol için önemli bir redoks reaksiyonu ko-enzimidir. Aşırı DNA hasarı, PARP-1'in aşırı aktivasyonuna, hücresel kaynakların kaybına ve nekrotik hücre ölümüne katkıda bulunur. NA'nın pankreatik β-hücrelerini STZ'nin ciddi sitotoksisitesine karşı koruyabildiği gösterilmiştir. STZ-NA modelinin, T2DM'yi tetiklemek için STZ'nin β-sitotoksik etkisine karşı kısmi koruma sağlama konusunda NA'nın yeterliliğine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Furman, 2021; Rais ve ark., 2022).



Şekil 2. Nikotinamid ve Streptozotosinin etki mekanizması

4.1.5. Tip 2 Diyabetes Mellitus tedavisi

T2DM'nin altında yatan mekanizmaların anlaşılırlığı arttıkça T2DM için kullanılan tedavi seçeneklerinin sayısı da artmıştır. T2DM hastaları ciddi fizyolojik stres durumları altında kalmadıkça yaşamları boyunca insülin tedavisine ihtiyaç duymazlar (Banday ve ark., 2020). T2DM'nin tedavisinde insülin bazlı olmayan geleneksel oral tedavi seçenekleri arasında sülfonilüreler (insülin sekretagogları), biguanidler (hepatik glukoz üretimini azaltırlar), peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör-γ (PPARy) agonistleri (insülinin etkisini artırır); α-glukosidaz inhibitörleri (bağırsakta glikoz emilimini engeller) yer almaktadır. Diğer antidiyabetik ilaçlar gizli mimetikler, amilin analogları ve SGLT2 inhibitörleridir (Padhi ve ark., 2020; Xu ve ark., 2022). Bu ilaç sınıfları monoterapi olarak uygulandığı gibi birbirleri ile kombine halde de verilebilirler. İlaçların klinik başarılarının yüksek düzeyde oldukları bildirilmiştir (Xu ve ark., 2022). Tablo 3' de oral antidiyabetikler ve etkinliklerine dair bilgiler yer almaktadır.

Tablo 3. Oral antidiyabetik ilaçlar

İLAÇ SINIFLARI	İLAÇLAR	ADVERS ETKİLER
İnsülin Duyarlılaştırıcılar		
Biguanidler	Metformin, fenformin, buformin	Laktik asidoz ve gastrointestinal yan etkiler
Tiazolidindionlar	PPARγ agonistler; rosiglitazon, pioglitazon ve siglitazon PPARα/γ agonistler; muraglitizar, tesaglitazar, aleglitazar, ragaglitizar, naveglitazar ve saroglitazar	Kardiyovasküler riskler, mesane kanser, su tutulumu, kilo kaybı ve hepatitis Gastrit ve asthenia
İnsülin Salgılatıcılar		
Sülfonilüreler	1. kuşak; tolbutamid, klorpropamid, tolazamid, asetoheksamid 2. kuşak; glibenklamid, glipizid, glimepirid	Hipoglisemi, fotosensitivite, kilo kaybı, döküntü, kardiyovasküler riskler ve kemik iliği hasarı.
Meglitinidler	Repaglinid, nateglinid	Hipoglisemi, kardiyovasküler riskler ve kemik iliği hasarı.
α-glukozidaz inhibitörleri	Akarboz, vogliboz, miglitol	Gastrointestinal etkiler, inflamatuar barsak hastalıkları, hepatitis
İnkretin Bazlı Tedaviler		
Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) agonistleri	Lixisenatid, dulaglutid, liraglutid, exenatid	Gastrointestinal etkiler, pankreatit, kanser riski ve kardiyovasküler olaylar
Dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri	Sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, linagliptin, alogliptin, gemigliptin, anagliptin, teneligliptin, alogliptin, trelagliptin ve omarigliptin	Pankreatit, akut hepatit, böbrek hasarı ve kanser riski.
Sodyum-glukoz ortak taşıyıcı 2 (SGLT2) inhibitörleri	Kanagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin.	Glukozüri, üriner ve genital sistem enfeksiyonları ve dehidratasyon
Amilin Agonistleri	Pramlinitid	Hipoglisemi ve alerji

Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği (AACE) ve Amerikan Diyabet Birliği (ADA) kuruluşları tercihen ilk basamak tedavi metformin olmak üzere monoterapi ile beraber yaşam tarzı değişikliklerini önermiştir (Xu ve ark., 2022). Ancak ADA ve Avrupa Diyabet Çalışmaları Derneği'nin (EASD) 2022'deki fikir birliği raporu, T2DM'li hastalar için, onların özel koşulları ve tercihleri dikkate alınarak daha kapsamlı ve bireyselleştirilmiş tedavi seçeneklerini önermektedir. 2018'den önce metformin, T2DM tedavisi için ADA ve EASD'nin görüş beyanında önerilen birinci basamak tedavi seçeneği iken bu strateji son yıllarda değişiklik göstermiştir. SGLT2 inhibitörlerinin ve GLP-1 reseptör agonistlerinin klinik çalışmalarda, glisemik kontrolün ötesinde, kardiyorenal sistem organlarını daha iyi koruduğu gösterilmiştir ve hastaların metabolik durumlarına göre ilk sırada yer almaya başlamışlardır (Chong ve ark., 2024).

4.1.5.1. Diyabetes Mellitus tedavisinde yeni gelişmeler

T2DM giderek yaygınlaşmasıyla birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar hayatı tehdit eden en önemli risk faktörleri haline gelmiştir. T2DM tedavisinde son zamanlarda oldukça önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Rejimler tedavi yöntemine, ilaçların türüne ve etkisine, organların korunma derecesine ve elde edilen kilo kaybına göre farklılık göstermektedir. Tedavi rejimleri ile ilgili gelişmeler komplikasyonları azaltmayı hedeflemektedir. Bu ilerlemeler sayesinde T2DM'li bireylerin yaşam kalitesini iyileştirmek hedeflenmektedir (Chong ve ark., 2024). HbA1C ve vücut ağırlıklarının değişimini de baz alarak tasarlanan ve güncel olarak faz aşamalarında çalışılan ilaç örnekleri aşağıda yer almaktadır.

- GİP/GLP-1 dual agonistleri

Tirzepatid çok fonksiyonlu bir peptiddir. Doğal gastrointestinal peptid (GİP) dizisinin, GİP ve GLP-1 reseptörlerine bağlanmasına izin verecek şekilde değiştirilmesiyle üretilir. Bir C20 yağlı diasit kısmı içeren 39 amino asitli doğrusal bir peptiddir. Ortalama yarı ömrü yaklaşık 5 gün (116,7 saat) olduğundan haftada bir kez dozlam mümkündür. *İn vitro* olarak tirzepatid, GİP reseptörü için doğal GİP'e benzer bir potansiyele ve afiniteye sahiptir. Ayrıca GLP-1 reseptörü için doğal GLP-1'e göre biraz daha zayıf bir etki ve afiniteye sahiptir

- Amilin/GLP-1 ikili reseptör agonistleri

Amilin, besin alımına yanıt olarak β-hücrelerinden insülin ile birlikte salgılanan bir pankreatik adacık hücre hormonudur. Yemek sonrası glukagonu baskılar ve mide boşalmasını geciktirir. Kagrilintide, monoterapi olarak deri altından uygulanan ve uzun etkili GLP-1 reseptör agonisti semaglutid ile kombinasyon halinde kullanılan, haftada bir uygulanan uzun etkili amilin analoğudur (Frias ve ark., 2023; Jastreboff ve Kushner, 2023).

- GİP/glukagon/GLP-1 üçlü reseptör agonistleri

Glukagon, pankreas adacıklarının alfa hücrelerinden salgılanan ve glikojenolizi ve glukoneojenezi uyaran 29 amino asitli bir peptittir. Glukagon normal bir fizyolojide kan glukozunu artırır, bu nedenle T2DM tedavilerinin hedefi antagonizmdir. Ancak GLP-1 agonistlerinin ve GİP-GLP-1 agonistlerinin vücut ağırlığını azaltıcı etkisini ortadan kaldırmak amacıyla enerji alımını azaltmak ve enerji harcanmasını artırmak için bu tedavilere glukagon eklenmiştir. Retatrutid, haftada bir kez intravenöz olarak uygulanan GİP/GLP-1/glukagon reseptörünün üçlü hormon agonistidir (Jastreboff ve Kushner, 2023; Rosenstock ve ark., 2023).

- Oral, peptit olmayan GLP-1 reseptör agonisti

Orforglipron, T2DM'nin tedavisinde kullanılan, peptit olmayan GLP-1 reseptör agonisti sınıfının küçük bir molekülüdür. Klinik öncesi ve erken klinik çalışmalarda Orforglipron olumlu bir oral biyoyararlanım (%20-40) ve farmakokinetik profil (doza bağlı olarak 29-49 saatlik bir yarılanma ömrü ile) sergiler. Orforglipron, T2DM ve obezitenin tedavisi için geliştirilmektedir (Jastreboff ve Kushner, 2023).

Yeni gelişmelere dair klinik çalışmaların sonuçlarını içeren veriler Tablo 4'de yer almaktadır.

Tablo 4. Besinle uyarılan hormonlarla ilgili Tip 2 Diyabetes Mellitus (faz 2 denemeleri) ve Tip 2 Diyabetes Mellitus olan obez (faz 3 denemeleri) bireyler için klinik denemeler (Chong ve ark., 2024'ten yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Klinik Çalışma	**Faz 3** **2.Aşama tamamlandı**	**Faz 2**	**Faz 2**	**Faz 2**
Referans	Lancet 2023; 402:613–626.	Lancet 2023; 402:720–730.	Lancet 2023; 402:529–544.	Lancet 2023; 402:472–483.
Karşılaştırma	Tirzepatide (15 mg) plaseboya karşı	-2.4 mg kagrilintid/ 2,4 mg semaglutid kombinasyonu -2,4 mg semaglutid ve -2,4 mg kagrilintide karşı	12 mg retatrutide 1,5 mg dulaglutide ve plaseboya karşı	Oral orforglipron 1,5 mg dulaglutide ve plaseboya karşı
Vücut ağırlığı değişimi (△BW)	−14.7% −3.2%	−15.6% −5.1% −8.1%	−16.94% −2.02% −3.00%	−10.1 −3.9 −2.2 kg
Çalışma süresi	72 hafta	32 hafta	32 hafta	26 hafta
HbA1c değişimi (△HbA1c)		−2.2% −1.8% −0.9%	−2.02% −1.41% −0.01%	−2.10% −1.10% −0.43%

Yeni tedavi rejimleri çalışılırken glisemik kontrolün sağlanamadığı T2DM'li bireylerde glisemik kontrolü sağlayabilmek amacıyla insülin analogları da çalışılmaktadır. Yeni antidiyabetik tedaviler sayesinde önemli bir kilo kaybı meydana gelir ve organların korunması sağlanır ancak T2DM tedavisinde asıl amaçlanan glisemik kontrolün sağlanmasıdır. İnsülin, T2DM'li bireylerde geleneksel antidiyabetik ajanlar kullanılarak kontrol edilemeyen kan glukozunun kontrolünde önemli bir rol oynar. Mevcut bazal insülin formülasyonları son derece etkilidir ve önceki nesil insülinlerle karşılaştırıldığında hipoglisemi riskinin azalmıştır, ancak yine de günlük doza uyumla ilgili güçlükler mevcuttur ve bu da zayıf glisemik kontrolle ilişkilidir.

- İnsülin icodec

Haftada bir kez yapılan bazal insülin enjeksiyonlarının, hipoglisemi riskinin düşük kalması koşuluyla klinikle ilgili durumları azaltacağı, tedaviye uyumu arttıracağı ve hastaların yaşam kalitesini iyileştireceği tahmin edilmektedir. İnsülin icodec, albümine güçlü geri dönüşümlü bağlanmaya izin veren ve insülin reseptörü için afinitenin azalmasına ve insülin reseptörü aracılı klerensin azalmasına yol açan, bir C20 yağ diasit yan zinciri ile açillenmiş bir insülin analoğudur. Kararlı durum farmakodinamik modeli, hipoglisemik etkilerin 7 günlük dozlama periyodu boyunca eşit şekilde dağıldığını göstermektedir (Chong ve ark., 2024).

- Ko-İnsülin

İnsülin direncinin moleküler temelini inceleyen bir çalışmada araştırmacılar, insülin reseptöründen ziyade insüline spesifik olarak bağlanan küçük bir molekül olan Ko-insülin'i tanımladılar. Bu 222 Da molekülü, insülinin A zinciri üzerindeki spesifik bir bölgeye bağlanarak A ve B zincirleri arasındaki etkileşimi başlatır ve insülin reseptörünü aktive eder. Bu aktivasyon bir dizi olayı tetikler: insülin reseptörü otofosforilasyonu, insülin reseptör substrat proteinlerinin fosforilasyonu ve "Ani" ve "Gecikmeli" yanıtlarla insülinin etkisi. 'Acil' yanıt, GLUT4 aracılı geçekleşen ve fosforile edilmiş bir insülin reseptör substrat molekülünün etkilediği bilinen hipoglisemik etkiyi içerir. Tersine, 'Gecikmiş' yanıt, fosforile edilmiş insülin reseptörünün spesifik fragmanlarının nükleer girişini içerir ve bu, potansiyel olarak başka bir fosforile edilmiş insülin reseptör substrat tarafından kolaylaştırılır. Daha da önemlisi, Ko-İnsülin yalnızca insülin sinyal olaylarını başlatarak işlev görür. Bu öncü çalışma, benzer küçük moleküllerin, memeli sistemindeki diğer peptit hormonlarının eylemlerine aracılık etmede rol oynayıp oynamadığı sorusunu gündeme getiriyor. Bu araştırma yeni diyabet ilaçlarının geliştirilmesine yol açabilir (Thampan ve ark., 2020).

4.2. Sodyum Glukoz Ortak Taşıyıcı-2 İnhibitörleri

SGLT2, böbreğin proksimal kıvrık tübülünün 1. segmentinde yer alır ve süzülen glukozun yaklaşık %90'ının yeniden absorbsiyonuna katkıda bulunur. SGLT2 inhibitörleri, böbreklerin proksimal tübüllerinde üriner glukozun yeniden absorbsiyonunu etkili bir şekilde azaltır ve böylece kan glukoz konsantrasyonu azalarak süreç glukozüri ile sonuçlanır (Attachaipanich ve ark., 2022).

Empagliflozin, dapagliflozin, kanagliflozin, ertugliflozin, sotagliflozin, iprafgliflozin, luseogliflozin ve tofogliflozin bu mekanizma ile etki gösteren SGLT-2 inhibitörü ilaçlardır. Halihazırda hem Avrupa İlaç Ajansı (EMA) hem de Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından lisanslanan dördü: kanagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin ve ertugliflozindir. Sotagliflozin (hem SGLT1 hem SGLT2 inhibitörü), Avrupa'da T1DM'li hastalarda kullanım için onaylanmıştır, ancak klinik kullanıma sunulmamıştır (Cowie ve Fisher, 2020).

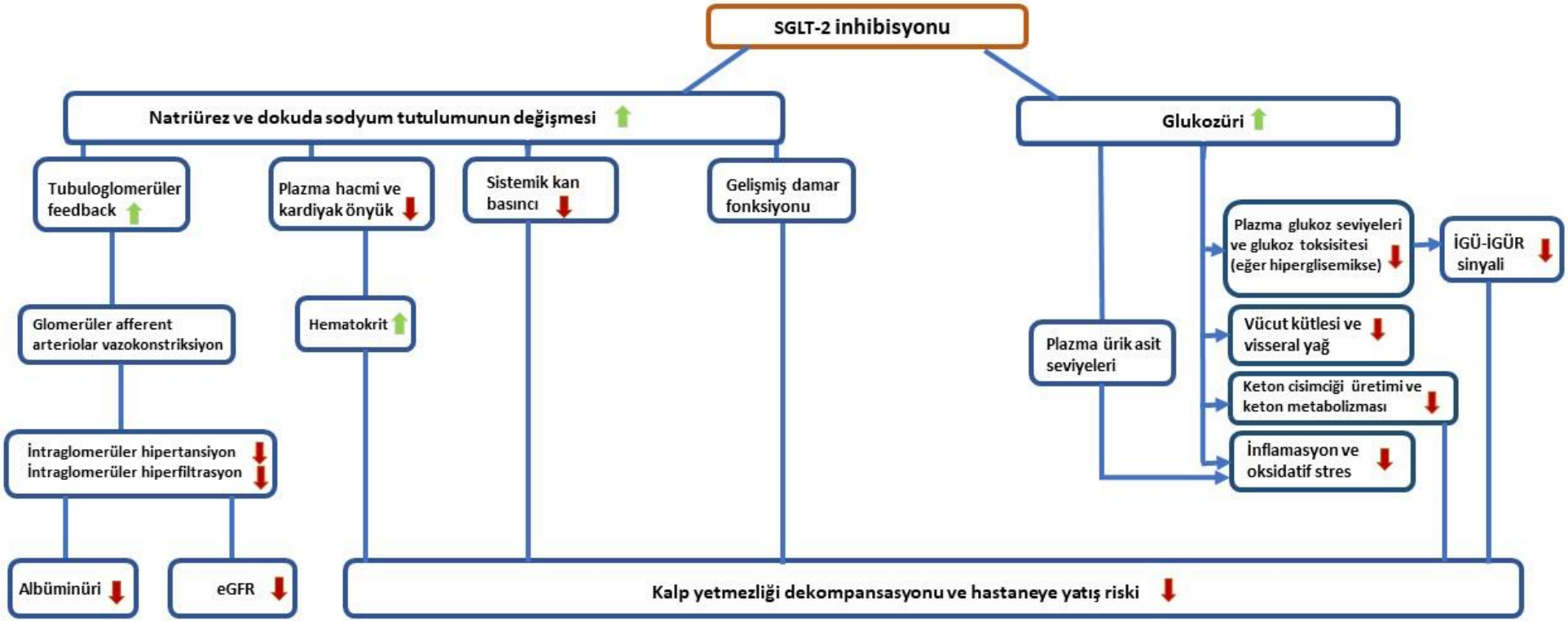
SGLT2 inhibitörleri ortak ve farklı özelliklere sahiptir. Örneğin; EMPA'nın (2500 kat), SGLT1'e kıyasla SGLT2'ye afinitesi DAPA (1200 kat) ve kanagliflozin (250 kat) ile karşılaştırıldığında SGLT2 reseptörleri için en yüksek seçiciliğe sahiptir (Nakhal ve ark., 2022). SGLT inhibitörlerinin temel farmakokinetik özelliklerinin karşılaştırılması Tablo 5'de yer almaktadır.

Tablo 5. Sodyum Glukoz Ortak Taşıyıcı inhibitörlerinin farmakokinetik özelliklerinin karşılaştırılması (Williams ve ark., 2021'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

İlaç (doz)	**Yarılanma ömrü (saat)**	**Oral biyoyararlanım (%)**	**Dağılım hacmi (L)**	**Plazma protein bağlanması (%)**	**Metabolizma ve eliminasyon**	**SGLT2 seçiciliği (SGLT1'e kıyasla)**
Kanagliflozin (100–300 mg)	10,6–13,1	65	83,5	98	Hepatik konjuge Böbrekten eliminasyon	~250 kat
Dapagliflozin (5–10 mg)	12.9	78	118	91	Hepatik konjuge Böbrekten eliminasyon	~1200 kat
Empagliflozin (10–25 mg)	12,4	60	73,8	86,2	Hepatik konjuge Böbrekten eliminasyon	~2500 kat
Ertugliflozin (5–15 mg)	16,6	100	85,5	93,6	Hepatik konjuge Böbrekten eliminasyon	~2000 kat

SGLT:Sodyum-glukoz ortak-taşıyıcı

SGLT inhibitörleri, böbrek glomerüllleri tarafından süzülen glukozun yeniden absorbsiyonundan sorumlu olan proksimal tübülde SGLT-2 ve distal tübülde SGLT1 adını alan taşıyıcıları bloke ederek etki gösterirler. Artan veriler SGLT inhibitörlerinin özellikle KY ve DM olan hastalarda glisemik kontrolün de ötesinde kardiyovasküler yararlar sağladığını gösterir (Şekil 3) (Cowie ve Fisher, 2020). Reseptörlere seçicilik dışında klinik farklarıyla ilgili bir diğer örnek EMPA klinikte kalple ve böbrekle ilgili olaylarda onay almışken diğer bir SGLT2 inhibitörü olan DAPA'nın kardiyovasküler güvenliği tanımlanmamıştır ancak kardiyovasküler ölümleri ve KY kaynaklı hastane yatışlarını azalttığı gösterilmiştir (Paschou ve Alexandrides, 2019).



Şekil 3. SGLT2 inhibitörlerinin kardiyovasküler yararı ile ilişkili şema (Cowie & Fisher, 2020' den yararlanılarak hazırlanmıştır.) SGLT2: Sodyum-glukoz ortak taşıyıcı-2; İGÜ:İleri glikasyon son ürünleri; İGÜR: İleri glikasyon son ürünlerinin reseptörü; eGFR: Glomerüler filtrasyon hızı.

4.2.1. Empagliflozin

EMPA 2014 yılında onaylanmıştır (Avrupa'da Mayıs 2014, ABD'de Ağustos 2014). EMPA, SGLT2 için SGLT1'e göre en yüksek seçiciliğe sahip (>2.500 kat) SGLT2 inhibitörüdür. Ayrıca metformin ve linagliptin ile kombinasyonu da mevcuttur. Önerilen doz, sabahları, yemekle birlikte veya yemeksiz, günde bir kez 10 mg'dır ve günde bir kez 25 mg'a kadar titre edilebilir. EMPA'nın biyoyararlanımı hakkında sadece ön veriler mevcut olup yaklaşık %75 civarında olduğu görülmektedir ve yemeklerden önce veya sonra alınabilmektedir. EMPA oral uygulamadan sonra hızla emilir (T_{max} 1,5 saat), proteinlere %86 oranında bağlanır ve yarılanma ömrü ($T_{1/2}$) 13 saattir, bu da onu günde tek doz uygulamaya uygun hale getirir. Ayrıca T2DM tedavisinde yaygın olarak kullanılan diğer ilaçlarla herhangi bir etkileşim bildirilmemiştir. EMPA, hem fekal (%40) hem de renal (%55) yolla elimine edilir. EMPA, kronik böbrek hastalığında (evre 2-3) iyi tolere edilir ve sadece evre 4'te bir miktar hipoglisemiye neden olmaktadır. Hamilelik veya emzirme döneminde kullanımı önerilmemektedir (Garcia-Ropero ve ark., 2018). Hipoglisemi riskinin düşük olması ve kilo verdirici özellikleri ile kardiyovasküler faydaları olan EMPA metformine alternatif ilk ilaç olarak karşımıza çıkmaktadır. Birden fazla randomize kontrollü çalışmada plaseboya kıyasla HbA1c, AKG ve sistolik kan basıncı (SBP)'nda azalma ile beraber kilo kaybı sağladığı gösterilmiştir (Xu ve ark., 2022). EMPA'nın, diyabetik popülasyonda diyabetle ilişkili kalp hastalığının ilerlemesini önlediği gösterilmiştir. DM ve diyabetle ilişkili olmayan kalp hastalıklarında EMPA ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. EMPA'nın kardiyoprotektif mekanizmaları, STZ ile indüklenen DM, yüksek yağlı diyet (HFD) ile indüklenen T2DM, HFD + düşük doz STZ gibi çeşitli hayvan modellerinde İR, kardiyak fibroz, oksidatif stres, metabolik düzenleme ve mitokondriyal biyogenez sinyal yolaklarına etkileri üzerinden değerlendirilmiştir. Günümüz beslenme ve yaşam tarzı değişiklileri nedeniyle meydana gelen DM ve aynı şekilde DM ilişkili artan kalp sorunları EMPA'nın kalpteki koruyucu etkisinin açığa çıkarılmasını elzem hale getirmiştir (Bugga ve ark., 2022).

4.2.2. Dapagliflozin

DAPA, dünyada onaylanan ilk SGLT2 inhibitörüdür (Avrupa, Kasım 2012; ABD Ocak 2014). Tek başına olduğu gibi metformin ve saksagliptin ile kombinasyon halinde mevcuttur. Başlangıç dozu 5 mg'dır ve 10 mg'a yükseltilebilir. DAPA, SGLT2 için SLGT1'e göre yaklaşık 1.200 kat daha seçicidir. DAPA'nın biyoyararlanımı %78'dir ve yüksek yağlı bir yemekle değişmemektedir, dolayısıyla öğünlerden bağımsız olarak alınabilme imkânı sunmaktadır.

DAPA oral uygulamadan sonra hızla emilerek, 1-1,5 saat sonra maksimum plazma seviyelerine (T_{max}) ulaşır. Plazma proteinlerine %78 oranda bağlanır ve yarılanma ömrü ($T_{1/2}$) 13 saattir, bu da DAPA'yı günde bir kez kullanıma uygun kılmaktadır. Ayrıca T2DM tedavisinde yaygın olarak kullanılan diğer ilaçlarla da herhangi bir etkileşim bildirilmemiştir. Orta-ağır böbrek yetmezliği olan hastalarda, diyaliz durumlarında, ≥75 yaş, gebelik durumunda veya emziren hastalarda önerilmemektedir. Ağır karaciğer yetmezliği olan hastalarda ise ilaca günde bir kez 5 mg olarak başlanmalıdır (Garcia-Ropero ve ark., 2018).

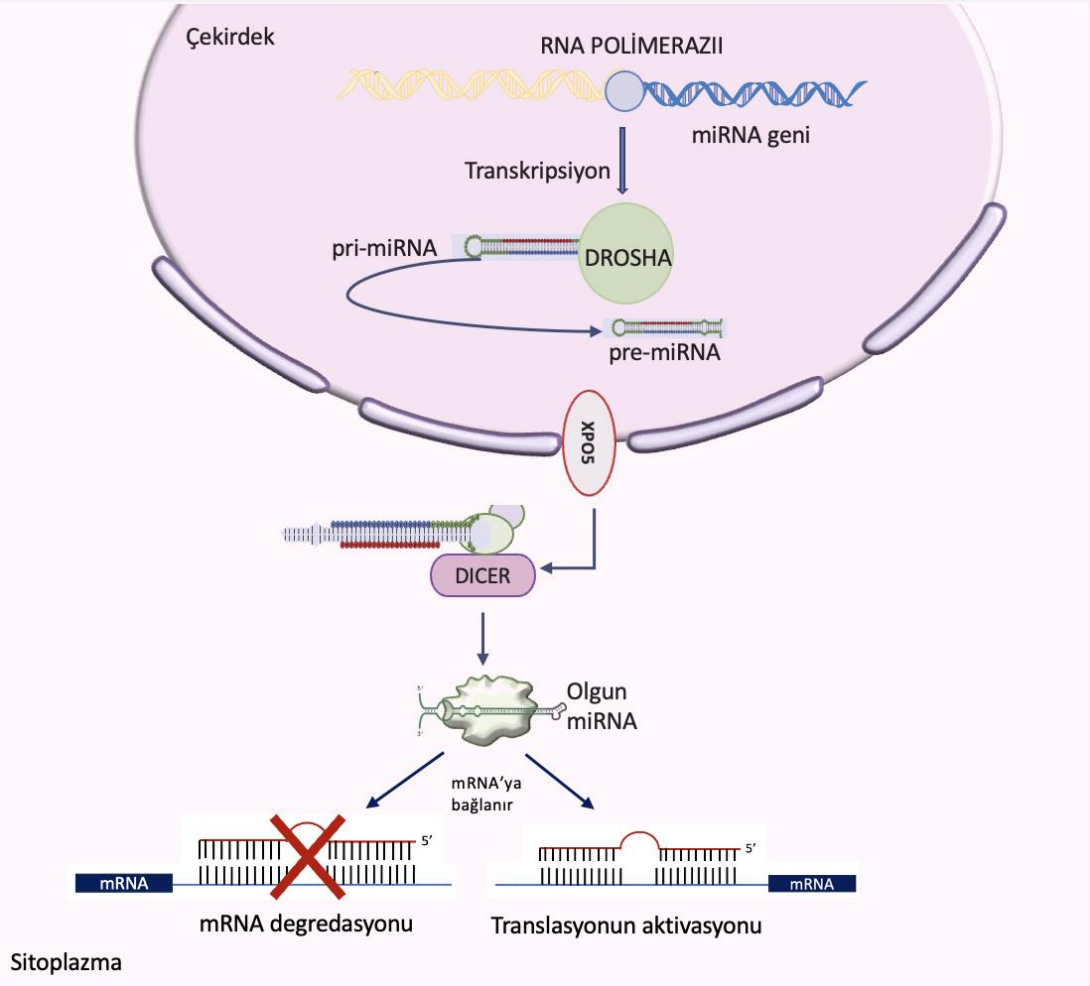
SGLT2 inhibitörleri, kardiyovasküler hastalıklarda diğer hipoglisemik ajanlara göre üstünlük göstermiştir. Oldukça seçici bir SGLT2 inhibitörü olan DAPA, T2DM'ye karşı etkili bir tedavi olarak kullanılmakta ve diyabetik nefropati gelişimini de engellemektedir. Çalışmalar DAPA'nın hem kardiyovasküler ölüm hem de KY nedeniyle hastaneye yatış oranını azalttığını kanıtlamıştır. Son zamanlarda DAPA'nın miyokardiyal NLRP3 inflamatuar aktivasyonunu azalttığı ve ob/ob T2DM farelerinde sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonunun şiddetlenmesini iyileştirdiği kanıtlanmıştır (Chen ve ark., 2020; Xing ve ark., 2021). Arow ve arkadaşları DAPA'nın db/db T2DM farelerinde ve izole kardiyomiyositlerde miyokardiyal inflamasyonu ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini azalttığını bildirmiştir. Bu veriler DAPA'nın anti-inflamatuar ve anti-oksidatif stres yoluyla diyabetik kardiyomyopati tedavisinde potansiyel bir ajan olduğunu göstermektedir. Ancak DAPA tedavisinin miyokardiyal ROS seviyelerinin azalmasına neden olan moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (Arow ve ark., 2020; Xing ve ark., 2021).

ROS içeriğinin artması olarak tanımlanan oksidatif stres, ROS üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesi oldukça önemli bir role sahiptir. NADPH oksidazlar (NOX'ler), ROS üreten ve diyabetik kardiyomyopatili kalpte arttığı bilinen anahtar enzimlerdir. DAPA'nın, NADPH oksidazları kısıtlayarak ve/veya süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimleri düzenleyerek diyabetik kardiyomyopatiyi iyileştirip iyileştirmediğini gösteren kanıtlar azdır (Xing ve ark., 2021).

4.3. microRNA

İlk mikroRNA (miRNA), *lin-4*, 1993 yılında Ambros ve Ruvkun isimli bilim adamları tarafından Horvitz'in laboratuvarında *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir. Bu durum, moleküler biyoloji alanında devrim niteliğinde bir etki uyandırmıştır (O'Brien ve ark., 2018).

miRNA'lar, hem protein translasyonunu inhibe ederek hem de mRNA bölünmesini teşvik ederek gen ekspresyonunu baskılayan küçük ve, kodlayıcı olmayan yaklaşık 22 nükleotidli RNA molekülleridir (Ho ve ark., 2022; Zhou ve ark., 2014). Bir miRNA'nın çok aşamalı biyogenez süreci çekirdekte başlar ve sitoplazmada biter (Şekil 4). miRNA'lar, çekirdekte RNA polimeraz II enzimleri tarafından transkripsiyona uğrayarak kopyalanır ve bir veya daha fazla saç tokası yapısına benzeyen birincil miRNA (pri-miRNA)'lar oluşur. Pri-miRNA'lar 5'cap ve 3'poli A kuyruğunun yer aldığı 3-4 kb uzunluğunda tek iplikli yapılara sahiptir (Mencia ve ark., 2023; Albayrak, 2022). Çoğu miRNA, DNA dizilerinden birincil miRNA'lara (pri-miRNA'lar) kopyalanır ve öncü miRNA'lara (pre-miRNA'lar) ve olgun miRNA'lara (mature miRNA) işlenir.



Şekil 4. microRNA'nın biyogenezi (Winter ve ark., 2009'dan yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Çoğu durumda miRNA'lar, ifadeyi baskılamak için hedef mRNA'ların 3' UTR'si ile etkileşime girer (Ha ve Kim, 2014). Ancak miRNA'ların 5' UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri dahil

olmak üzere diğer bölgelerle etkileşimi de rapor edilmiştir (Broughton ve ark., 2016). Ayrıca miRNA'ların belirli koşullar altında gen ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (Iantomasi ve ark., 2023). Son çalışmalar, miRNA'ların, çeviri hızını ve hatta transkripsiyon hızını kontrol etmek için farklı hücre içi bölümler arasında gidip geldiğini ileri sürmektedir (Makarova ve ark., 2016). Bazen miRNA'lar, benzer tohum bölgelerine sahip olabilen kümeler adı verilen uzun bir transkript olarak kopyalanır ve bu durumda bir aile olarak kabul edilirler (Tanzer ve Stadler, 2004).

miRNA'lar hayvanların normal gelişimi için kritik öneme sahiptir ve çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar (Iantomasi ve ark., 2023). miRNA'ların anormal ekspresyonu birçok insan hastalığıyla ilişkilidir (Paul ve ark., 2018; Tüfekci ve ark., 2014). Ayrıca miRNA'lar hücre dışı sıvılara da salgılanır. Hücre dışı miRNA'ların çeşitli hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olduğu geniş çapta rapor edilmiştir ve aynı zamanda hücre-hücre iletişimine aracılık eden sinyal molekülleri olarak da görev yaparlar (O'Brien ve ark., 2018).

Bugüne kadar yapılan çoğu çalışma, miRNA'ların, translasyonel baskıyı ve mRNA deadenilasyonunu ve başlık açmayı tetiklemek için hedef mRNA'larının 3' UTR'sindeki spesifik bir diziye bağlandığını göstermiştir (Huntzinger ve Izaurralde, 2011; Ipsaro ve Joshua-Tor, 2015). miRNA bağlanma bölgeleri aynı zamanda 5' UTR ve kodlama dizisi dahil olmak üzere diğer mRNA bölgelerinde ve ayrıca promoter bölgelerinde de tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2014). miRNA'ların 5' UTR'ye ve kodlama bölgelerine bağlanması, gen ekspresyonu üzerinde susturucu etkilere sahiptir (Ryczek ve ark., 2023). Aksine miRNA'nın promotör bölgesi ile etkileşiminin ise transkripsiyonu indüklediği rapor edilmiştir (Dharap ve ark., 2013). Ancak bu tür etkileşim tarzının işlevsel önemini tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Keşfedilmelerinden bu yana, çok sayıda miRNA tanımlanmış ve bunların işlevlerinin yanı sıra araştırma ve klinik uygulamadaki kullanımlarının bulunmasına yönelik önemli ilerlemeler de kaydedilmiştir (Ho ve ark., 2022).

4.3.1. Tip 2 Diyabetes Mellitus ve miRNA arasındaki ilişki

Mersey ve arkadaşları miR-29b'nin insan metabolik yolu düzenlemesindeki rolüne dair ilk kanıtları sunmuşlardır (Rottiers ve Näär, 2012). İlk olarak miR-375'in insülin sekresyonunun düzenlenmesindeki rolünün keşfedilmesiyle miRNA'nın T2DM gelişimi sürecindeki etkileri tanımlanmıştır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, miRNA'ların pankreas hücresinde olduğu gibi hedef dokular olan iskelet kasında, yağ dokusunda ve karaciğerde insülin üretiminde ve

insülin fonksiyonunda rol oynadığını göstermiştir. T2DM gelişimi sırasında kan dolaşımında yağ asitleri ve glukoz gibi metabolitlerin artan seviyeleri de miRNA seviyelerindeki değişikliklere neden olabilir (Afsharmanesh ve ark., 2023). DM'li bireylerde miR-29 ailesinden miRNA'lar karaciğer, böbrek, yağ dokusu ve iskelet kası dokusu dahil olmak üzere çeşitli dokularda eksprese edilir. Çok sayıda kanıt; miR-29a, miR-29b1, miR-29b2 ve miR-29c dahil olmak üzere miR-29 ailesini β hücrelerindeki çeşitli fonksiyonların anahtar modülatörleri olarak tanımlamıştır (Latreille ve ark., 2014; Roggli ve ark., 2012). Hiperglisemi ve inflamasyon gibi DM'nin ayırt edici özelliklerinin miR-29 ailesi miRNA'larının yukarı regülasyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Roggli ve arkadaşları, pankreas β-hücrelerinin proinflamatuar sitokinlere maruz kalmasının miR-29 ailesi üyelerinin ekspresyonunu ve dolayısıyla hücre ölümünü arttırdığını göstermiştir. Bir hayvan modeli çalışmasında, β-hücrelerinde inflamasyon ile miR-29 artış düzeyleri arasındaki ilişki ortaya çıkarılmıştır. Roggli ve arkadaşlarının hayvan modelleri üzerinde yaptığı bir çalışma, inflamasyon ile β hücrelerinde miR-29'un aşırı ekspresyonu arasında bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmıştır (Roggli ve ark., 2012).

Tüm bu çalışmalardan hareketle miRNA ve T2DM ilişkisinin oldukça karmaşık olduğu söylenebilir ve bu ilişkiyi açıklarken tek bir normdan bahsetmek güçtür. Daha açık ifade etmek gerekirse miRNA'lar birçok biyolojik olayda düzenleyici olarak rol oynayarak T2DM gibi metabolik hastalıklarla önemli bir korelasyon gösterirler (Afsharmanesh ve ark., 2023). Bu korelasyondaki bozulmalar hastalıklara neden olabileceği gibi organizmada hastalığa bağlı meydana gelen değişiklikler de miRNA'ların ekspresyonlarında bozukluklara yol açmaktadır. T2DM sırasında süregelen hiperglisemi, inflamasyon, oksidatif stres ve İGÜR gibi parametreler miRNA düzenlenmesini etkiler. Hiperglisemi ve hipergliseminin meydana getirdiği oksidatif stres tüm miRNA ekspresyonlarını etkileyebilmektedir. Yüksek glukoza maruz kalan diyabetik kardiyomyopati modelinde 300'den fazla farklı miRNA'nın ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir (Jakubik ve ark., 2021). "Hiperglisemik" veya "metabolik" hafıza olarak bilinen fenomen dolayısıyla hiperglisemik koşullar normoglisemik koşullara ulaşsa da hipergliseminin olumsuz etkileri devam edebilir. Hiperglisemik hafızadan miRNA'lar da etkilenir ve ekspresyonlarındaki değişiklikler normoglisemik koşullarda dahi devam edebilmektedir. Bu da miRNA-gen etkileşimlerini ve ilgili sinyal yolaklarını kavrama noktasında daha karmaşık bir tablo oluşturur (Costantino ve ark., 2016; Jakubik ve ark., 2021).

4.3.2. Kalp dokusu ve miRNA ilişkisi

Kalp hastalıklarının patofizyolojisindeki bir rol, miRNA'lar tarafından geri kazanılır. miRNA'lar, mRNA'nın tamamlayıcı sekansları ile kusurlu baz eşleşmesi yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyebilen, translasyonel baskıya veya transkript bozulmasına yol açan, korunmuş kodlayıcı olmayan yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, tek sarmallı RNA moleküleridir. Yıllar boyunca, birçok miRNA araştırılmış ve miyokard enfarktüsü, kardiyak hipertrofi, aritmiler, kontraktilite kusurları ve kronik KY gibi çeşitli kardiyak patojenik durumlarda yukarı veya aşağı doğru regüle edildikleri bulunmuştur. miRNA'lar, neredeyse tüm kardiyak biyolojik süreçlerde ve çoklu fizyolojik fonksiyonlarda yer alan hayati post-transkripsiyonel düzenleyiciler olarak ortaya çıkmaktadır. Çeşitli miRNA'ların her kardiyak patofizyolojik olayı düzenlediği ve tek bir miRNA'nın birden fazla mRNA hedefi olabileceği bilinmektedir. Bu gen ekspresyonu düzenleme mekanizması ile miRNA'lar, KY'nin uyumsuz yeniden şekillenmesinde rol oynayan ağları modüle etmek için heyecan verici ve yeni bir terapötik hedeftir. Örneğin; miRNA-1, miRNA-133, miRNA-378, miRNA-185 ve miRNA-155 anti-hipertrofik kardiyak etkiler gösterirken miRNA-208 ailesi miRNA-212/132, miRNA-23 ve miRNA-199'un kardiyomiyosit hipertrofisini desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca miRNA-133, miRNA-21, miRNA-30 ailesi, miRNA-138, miRNA-499 ve miRNA-181c'nin miyokardiyal hücre apoptozunu indüklediği, miRNA-28'in ise kardiyomiyositlerde antiapoptotik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Mascolo ve ark., 2022). Ek olarak, miRNA-34a'nın apoptoz, yaşlanma ve enerji metabolizması ve kalp onarımı gibi hücresel süreçleri etkilediği gösterilmiştir ve antrasiklinlere (doksorubisin gibi) maruz kalan hayvanlarda ve hastalarda ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. miRNA'ları hedef olarak kullanmanın terapötik potansiyeli, bir doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite modelinde Ant34a'nın uygulanması yoluyla miRNA-34a'nın susturulmasını araştıran yakın tarihli bir klinik öncesi çalışmada gösterilmiştir. Çalışma, Ant34a'nın miRNA-34a miyokardiyal ekspresyonunu tamamen susturabildiğini ve B-hücreli lenfoma-2 (BCL-2) ve sirtuin-1 geni (SIRT1) gibi hayatta kalma öncüsü moleküllerin sentezini artırarak doksorubisin kaynaklı kardiyak disfonksiyonu azaltabildiğini bulmuştur (Piegari ve ark., 2020). Bu bulgular, miRNA-34a inhibisyonunun onkolojik hastalarda çok faydalı olabilecek doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteyi azaltmadaki potansiyel terapötik rolünü ortaya koyar. Bu sonuçlar ilginç olsa da, miRNA'ların kardiyak hipertrofi, fibrozis ve apoptoza karşı potansiyel terapötikler olarak rolünün klinik pratikle aydınlatılmasına ve bilim dünyası tarafından daha çok çalışılmasına ihtiyaç vardır. Ancak özellikle etkili miRNA hedeflerinin, farmasötik formülasyonlarının ve farmakokinetik

profillerinin meydana getirdiği güçlükler dolayısıyla miRNA'ların klinik kullanımları hala çok uzaktadır.

4.3.3. Tip 2 Diyabetes Mellitus'ta kalp dokusunda miRNA'lara neler oluyor?

miRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz, nekroz, hücre göçü ve farklılaşma dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte kritik öneme sahip olduğu göz önüne alındığında, miRNA'ların ekspresyonlarındaki düzensizlikler DM ve kardiyovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere birçok hastalığa katkıda bulunur (McClelland ve Kantharidis, 2013; Vickers ve ark., 2013).

Hiperglisemi kalpte doku homeostazını sağlayan miRNA'ların ekspresyonunda değişiklikler meydana getirir (Costantino ve ark., 2016). Meydana gelen değişiklikler sonucunda gen ifadelerinde de bozulmalar oluşabilir. Genlerin ifade edilmesindeki değişiklikler yalnızca bir kısmı tersine çevrilebilir. Böylece miRNA-gen etkileşimleri daha da karmaşık bir hal almakta ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinin büyük önemine işaret etmektedir (Jakubik ve ark., 2021). Örneğin; insan kardiyomiyositlerinde yapılan bir çalışmada YG maruziyetinin miR-9 ekspresyonundaki azalmaya neden olduğu ve buna bağlı olarak miR-9'un hedef proteini olan ELAV benzeri protein 1 (ELAVL1)'in arttığı gösterilmiştir. Artan ELAVL1 kaspaz-1 i aktive ederek interlökin-1β (IL-1β) ve kaspaz seviyelerindeki artma ile inflamasyon ve hücre ölümünü başlatır. ELAVL1'in direkt miR-9'un hedefi olması dolayısıyla diyabet indüklü kardiyomiyosit ölümü ve inflamasyonu gibi ELAVL1 aracılı hastalıklarda miR-9 ekspresyonunun düzenlenmesi tedavide önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır (Jeyabal ve ark., 2016). Son çalışmalar, miRNA'ların anormal ekspresyonunun aynı zamanda diyabetik kardiyomiyopatiye aracılık ederek patogeneze de katıldığını göstermektedir; çalışmalarda miR-1, -133, -141, -206, -223'ün yukarı regüle edildiği rapor edilirken miR-133a, -373 ve -499 aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Shantikumar ve ark., 2011; Shen ve ark., 2011). Bu nedenle, diyabetik kardiyomiyopatinin gelişiminde miRNA'ların rolüne dair fikir edinmek, moleküler mekanizmaların açıklığa kavuşturulmasına ve diyabetik kardiyomiyopati için yeni terapötik stratejilerin belirlenmesine yardımcı olacak hayati öneme sahiptir (Ridwan ve ark., 2023).

Kardiyomiyosit hipertrofisi, miyokardiyal fibrozis ve kardiyomiyosit apoptozu diyabetik kardiyomiyopatinin önemli özellikleridir. Örneğin; miR-133a'nın aşağı regülasyonu, miyokard hipertrofisinde rol oynayan iki transkripsiyon faktörü olan miyosit artırıcı faktör 2A (MEF2A) ve (MEF2C)'nin ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek kardiyomiyosit hipertrofisini indüklerken miR-1 ve miR-206'nın yukarı regülasyonu, ısı şok proteini (Hsp) 60, PIM 1 ve

IGF-1 reseptörünün ekspresyonunu baskılayarak kardiyomiyosit apoptozunun artmasına katkıda bulunur (Feng ve ark., 2010; Katare ve ark., 2011; Shan ve ark., 2010). miR-22 ise diyabetik kardiyomiyopati vakalarında oksidatif stres hasarıyla ilişkilendirilmiştir (Tang et al., 2018).

Tüm bu bilgiler ışığında klinik kullanımlarından hala uzak olsak da miRNA'ların kardiyovasküler hastalıklar için biyobelirteçler olarak potansiyel kullanımına dair bilimsel kanıtlar her geçen gün artmaktadır. miRNA'ların kardiyak hipertrofi, fibroz ve apoptoza yönelik potansiyel terapötikler olarak hayati rolleri ortadadır. DM'li kalpte ekspresyonu artan ve azalan miRNA'ların modüle edilebilmesi patogenezden sorumlu miRNA'nın hedefi olan proteinlerin meydana getirdiği hastalıklarda tedavi açısından oldukça önemli bir yer tutar. Özellikle klinik uygulamada etkili miRNA hedefleri, farmasötik formülasyonlar ve farmakokinetik profiller noktasındaki zorlukları ile aydınlatılması gereken önemli bir alandır ve çalışmalarda bu konu son zamanlarda sıkça yer almaktadır (Costantino ve ark., 2016; León ve ark., 2016; Mascolo ve ark., 2022).

Bu tez çalışmasında literatür taramaları sonucunda daha önce DM'li kalpte ekspresyonunda değişiklik gözlemlenen 10 miRNA geni belirlenmiştir;

miR-133a; kardiyak hipertrofi fizyolojisinde yer alır ve yenidoğan sıçan kardiyomiyositlerinde YG seviyeleri ile ekspresyonu azalmaktadır (León ve ark., 2016). miR-133a aşırı ekspresyonunda ise kronik KY'li sıçanlarda serin/treonin kinaz Akt'ı inhibe olmuş ve kalpteki fibrozis önemli ölçüde azalmıştır (Li ve ark., 2018).

miR-223; DM'li hastaların kalp dokusundaki artışı GLUT4 geninin sentezini inhibe ederek glukoz alımını azaltır. Yenidoğan sıçan kardiyomiyositlerinde miRNA-Mrna etkileşimi bunu doğrulamıştır (León ve ark., 2016).

miR-373; sıçan kardiyomyositlerinde yapılan *in vitro* çalışmada YG maruziyeti sonrasında genin ekspresyonunun aşırı artışı sonucunda kas hücrelerinin farklılaşmasında rol alan MEF2C ve hipertrofi azalmıştır. miR-373 yaygın olarak kalp dokusunda bulunur ve MEF2C'nin hedef genidir (Jakubik ve ark., 2021).

miR-22; ekspresyonu oksidatif stresle direk ilişkilidir ve ekspresyonundaki azalma sonucunda kardiyoproktektif etki görülür. Oksidatif stresin fazla artması sonucunda DNA mutasyonuna ve hatta tamamen hücre hasarına neden olan süperoksit ve hidrojen peroksit gibi ROS meydana gelir. SIRT1'in hedef genidir. Sıçan kalp hücrelerinde ve diyabetik farelerde miR-22 ekspresyonu artarak YG sonucunda meydana gelen oksidatif hasara karşı SIRT1'e bağlı koruyucu etki göstermiştir. miR-22'nin aşırı ekspresyonu SIRT1 yolağını aktive ederek oksidatif stresi azaltır (Jakubik ve ark., 2021; Tang ve ark., 2018).

miR-9; ekspresyonu yüksek doz glukoza maruz kalan kardiyomyositlerde ve diyabetik insan kalbinde azalmıştır. miR-9 sentezindeki azalma hiperglisemik koşullarda kalp hücresinde ekspresyonu artan ELAVL1 seviyelerini arttırır. ELAVL1 diyabetik insan kalbinde IL-1β ile artış gösterir (Jeyabal ve ark., 2016).

miR-146a; NF-kB, IL-6, TNF- α, IL-1β genleri ile ilişkilidir. miR-146a ekspresyonunun azaldığı durumlarda NF-kB, IL-6, TNF-α ve IL-1β artışı meydana gelir. Bu nedenle miR-146a ekspresyonunun artışı kardiyoprotektif rol sergileyerek bu etkiyi tersine çevirir (Jakubik ve ark., 2021).

miR-21; diyabetik kardiyomyopatide otofaji ve inflamasyon mekanizmalarının düzenlenmesinde rol alır. Farelerde ve sıçanlarda STZ indüklü DM modelinde miR-21 ekspresyonu artış göstermiştir. miR-21 artışı sonucunda kardiyak fibroblastlarda proliferasyon, fibronektin, kolajen gibi proteinlerin artışı meydana gelir ve kardiyak disfonksiyon veya kardiyak fibrozisle sonuçlanır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler KY'nin teşhisinde miR-21'in potansiyel bir biyobelirteç olabileceği yönündedir (Jakubik ve ark., 2021; Jin, 2021).

miR-144; doğrudan nükleer faktör eritroit 2 ilişkili faktör 2 (Nrf2) yi hedef alarak oksidatif stresin ve apoptozun regülasyonunda rol alır. STZ ile indüklenen diabetik farelerde ve YG'ye maruz kalan hücrelerde ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (Jakubik ve ark., 2021). Aşırı eksprese olduğu durumda ise mitokondriyal biyogenez ve apoptoza karşı YG'ye maruz kalan hücreleri korumuştur (Tao ve ark., 2020).

miR-221; STZ indüklü T1DM sıçanlarda ve YG'ye maruz kalan sıçan kalp hücrelerinde ekspresyonunda artış bulunmuştur. Otofajide yer alan ve hedeflediği GAS5 ve p27

proteinlerinin sentezini değiştirerek diyabetik kalpte otofajiyi azaltır. miR-221-3p/p27/mTOR/kalsinörin/NFAT sinyal yolağı üzerinden kardiyak hipertrofi ve kalp hasarına neden olur. Hiperglisemik koşullardan normoglisemik koşullara ulaşıldığında dahi miR-221 ekspresyonundaki artış diyabetik myokardiyal hasarın ilerlemesinde anahtar rol oynamaktadır (Jakubik ve ark., 2021; Jin, 2021).

miR-34a; oksidatif stresle ilişkilidir ve anjiyojenik etkiler gösterir. Kardiyak yaşlanma ve DM'de mediyatör olarak karşımıza çıkar. *İn vitro/in vivo* DM'li kalpte ve plazmada miR-34a ekspresyonu artar. AntimiR-34a verilerek koruyucu etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada sınırlı koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (Bernardo ve ark., 2022; Huang ve ark., 2022; Jakubik ve ark., 2021). Ancak bu bilginin aksine diyabetik KY ile ilişkili genlerin seçildiği başka bir çalışmada STZ indüklü DM modelinde miR-34a'nın ekspresyonunun kalp dokusunda azaldığı gösterilmiştir (Bernardo ve ark., 2022). Literatürde yer alan bu çelişkiler sebebiyle miR-34a geni de çalışmamızda T2DM'li kalpte değerlendirilmek üzere hedef olarak seçilmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

- ✓ Etanol (%70)
- ✓ Etanol (%99)
- ✓ Dietil eter 2,5 L (Isolab 914.023.2501)
- ✓ Sodyum sitrat tribazik dihidrat (AFG Bioscience 23170; ACS Reagent 1 kg)
- ✓ Sitrik asit monohidrat (AFG 386955-1KG ; ACS Reagent 1 kg)
- ✓ Streptozotosin (U-9889) 1 g (SANTA CRUZ sc-200719)
- ✓ Nikotinamid, 100 g (Santa Cruz sc-208096)
- ✓ DNAaz, RNAaz, Proteaz içermeyen su 1 L (Fisher Scientific BP2819-1)
- ✓ Teknik solvent (absolute) 2,5 L (Merck 100983.2511)
- ✓ Kloroform 2.5 L (MERCK 1.02445.2500)
- ✓ İzopropanol %100 Ekstra Pur Ph.Eur.,Bp,Usp 2,5 L (Merck 1.00995.2500)
- ✓ Trizol RNA/DNA/Protein İzolasyon Ajanı 100 ml (Bioshop Canada TRI118.100)

5.1.2. Kullanılan cihazlar

- ✓ Mikropipet (0-10 µl, 20-100µl, 100-1000µl)
- ✓ Roche Accu Check Active Kan Şeker Ölçüm Cihazı (Roche)
- ✓ Accu Chek Active Şeker Ölçüm Çubuğu 50 Strip (431475695)
- ✓ Gerçek Zamanlı PCR Cihazı (BioRad CFX Connect™ Real-Time PCR)
- ✓ Otoklav (Nuve)
- ✓ Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000)
- ✓ Saf Su Cihazı (ELGA Millipore)
- ✓ Hepa Filtreli Laminar Flow Kabin (Thermo Scientific)
- ✓ Derin dondurucu (-80ºC)
- ✓ Derin dondurucu (-20 ºC)
- ✓ Soğutmalı Santrifüj (Beckman coulter Allegra X-30R)
- ✓ Masaüstü Mini Santrifüj (Beckman Coulter, Inc.Allegra 16)
- ✓ PZR Cihazı (BioRad T100 Termal Cycler)

- ✓ pHmetre
- ✓ Vortex

5.1.3. Kullanılan kitler

- ✓ SYBR Green PCR Kit
- ✓ miRCURY LNA RT Kit (QİAGEN 339340)
- ✓ miRCURY LNA miRNA PCR Assay 200 (QIAGEN 202602)
- ✓ Rat, Süperoksit dismutaz (SOD) ELİSA Kiti 96 test (BT-LAB E1376Ra)
- ✓ Rat, IL-1β ELİSA Kiti (BT LAB E0143Ra)
- ✓ Rat, İGÜR ELİSA Kiti 96 test (BT-LAB E0928Ra)
- ✓ Rat kTnI ELİSA Kiti 96 well (BT-LAB E0639Ra)

5.1.4. Diğer malzemeler

- ✓ EDTA'lı tüp
- ✓ Vakumlu EDTA'lı tüp mor kapak 10 ml 100/pk (455036)
- ✓ Filtreli pipet ucu (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- ✓ Mikrosantrifüj tüpü - P.P - 1,5 ml - DNA & RNA free - steril sertifikalı 500/pk (Isolab - 078.03.022)
- ✓ Filtreli pipet ucu (0,1-10 µl) (Rainin 17002904)
- ✓ Tüp - cam - 16 x 100 m m 100/pk (Isolab - 077.01.004)

5.2. Yöntem

5.2.1. Deneyde kullanılan hayvanlar

Çalışmalar için 06.09.2022 tarihinde Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (EK 1) alınmıştır (Protokol Kodu : 46.2022.mar). Bu çalışmada her grupta 8 adet olacak şekilde toplamda 32 adet 3-4 aylık Sprague-Dawley dişi-erkek sıçan (250-350 g) Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAMER)'nden temin edilmiştir. Deneyler DEHAMER'de gerçekleştirilmiştir. Deneyler süresince 12 saat aydınlık–12 saat karanlık döngü sağlanarak, nem oranı %50-60 oranında tutulmuş ve hayvanlara kafeslerinde sürekli olarak standart laboratuvar yemi ve suyu bırakılarak beslenmeleri sağlanmıştır. Sıcaklığı sabit tutulan (22±2 °C) hayvan saklama

odasında her kafeste en fazla 4 sıçan olacak şekilde hayvanlar barındırılmıştır. Tüm deneyler günün aydınlık periyodunda ve sessiz olan odada gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. Deney gruplarının oluşturulması ve sıçanların numaralandırılması

5.2.2. Deney gruplarının oluşturulması ve modelin indüksiyonu

Her grupta 8 hayvan olacak ve sıçanlar aşağıda olduğu gibi 4 gruba ayrılmıştır:

1. Kontrol grubu (K): Bu gruptaki hayvanlara ilk gün intraperitoneal (i.p.) olarak sitrat tamponu uygulanmıştır. 28 gün boyunca hiçbir tedavi uygulanmaksızın yalnızca peroral yol ile distile su verilmiştir.

2. T2DM grubu (T2DM): Bu gruptaki hayvanlara 100 mg/kg NA + 55 mg/kg STZ intraperitoneal (i.p.) uygulanarak T2DM modeli oluşturulmuş ve 28 gün boyunca hiçbir tedavi uygulanmaksızın yalnızca peroral yol ile distile su verilmiştir.

3. T2DM + EMPA (EMPA): Bu gruptaki hayvanlara 100 mg/kg NA+ 55 mg/kg STZ (i.p.) uygulanarak T2DM modeli oluşturulmuş ve 28 gün boyunca oral olarak EMPA (10 mg/kg) uygulanmıştır.

4. T2DM + DAPA (DAPA): Bu gruptaki hayvanlara 100 mg/kg NA+ 55 mg/kg STZ (i.p.) uygulanarak T2DM modeli oluşturulmuş ve 28 gün boyunca oral olarak DAPA (1 mg/kg) uygulanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. *İn vivo* çalışma grupları

Grup Adı (n=8)	**Tedavi**
Kontrol	Yalnızca sitrat tamponu uygulanan grup (p.o)
T2DM	Hiçbir tedavi uygulanmayan grup
EMPA	28 gün boyunca empagliflozin (10 mg/kg; p.o) tedavisi uygulanan grup
DAPA	28 gün boyunca dapagliflozin (1 mg/kg; p.o) tedavisi uygulanan grup

STZ/NA ile T2DM Modelinin Oluşturulması:

Sıçanlarda T2DM modeli, STZ/NA indüklemesi ile oluşturulmuştur. Deney gününden önce sıçanlar gece boyunca (12 saat) aç bırakılmıştır. Bu sırada su alımlarında herhangi bir kısıtlama yapılmamıştır. Sitrat tamponu, STZ ve NA çözeltileri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

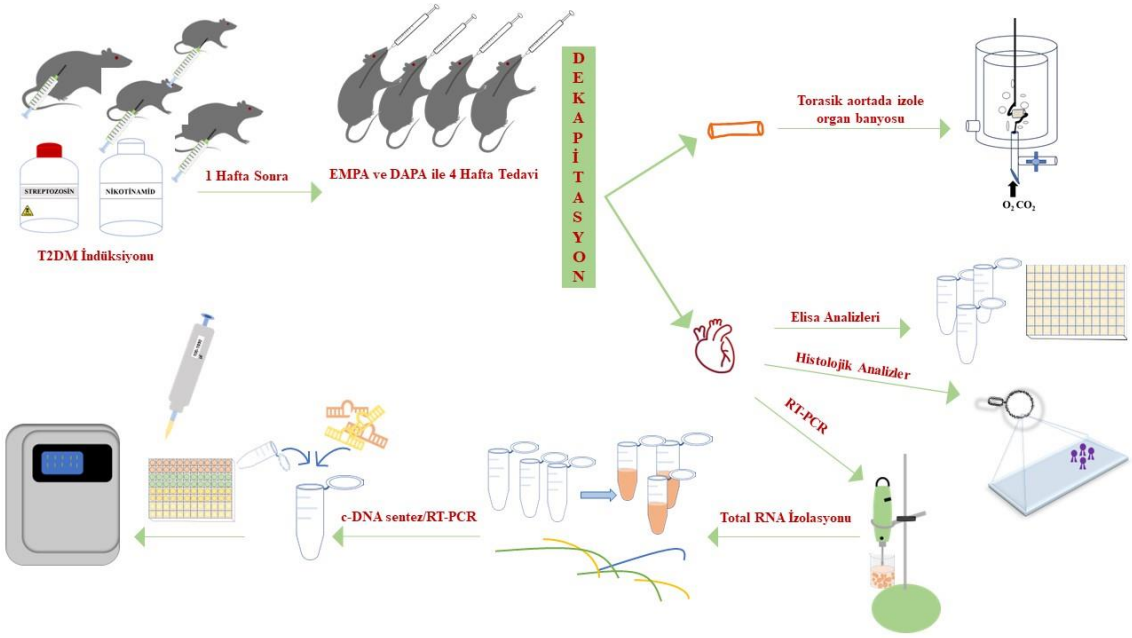
Sitrat tamponu; için sitrik asit monohidrat tartarat (0.21 g) ve trisodyum sitrat dihidrat tartarat (0.294 g) tartılıp ayrı ayrı 100 ml distile suda çözülmüştür. Sitrik asit monohidrat tartarat çözeltisinden 44.5 ml ve ve trisodyum sitrat dihidrat tartarat çözeltisinden 55.5 ml alınarak pH 4,5 olana kadar pHmetre ile ayarlama yapılmıştır (Kullanılan Ph-Metre: HANNA Instrument).

STZ çözeltisi; ortalama hayvan ağırlığı belirlenir ve toplam sayı baz alınarak 55 mg/kg uygulamaya yetecek kadar STZ tartılarak buz içerisinde bekleyen sitrat tamponu ile hazırlanmıştır.

NA çözeltisi; ortalama hayvan ağırlığı belirlenir ve toplam sayı baz alınarak 100 mg/kg uygulamaya yetecek kadar NA tartılarak buz içerisinde bekleyen sitrat tamponu ile hazırlanır.

Deney günü sıçanların ağırlıklarını belirlemek ve doz hesabı yapmak amacıyla tüm sıçanlar tartılmıştır. Kontrol grubu dışında kalan sıçanlara 100 mg/kg dozunda NA'nın i.p. enjeksiyonla verilmesinden 15 dakika sonra 0.1 M pH 4,5'lik sitrat tamponunda taze olarak hazırlanan ve deney süresinde buz içerisinde soğukta muhafaza edilen 55 mg/kg dozunda STZ (maske, eldiven ve gözlük kullanılarak tartılıp hazırlanır ve uygulanır) i.p. enjeksiyonla verilmiştir. STZ'nin tartım aşamasından uygulama aşamasına kadar maske ve gözlük takılmış, eldiven ve önlük giyilmiştir. STZ/NA uygulanan sıçanların suluklarına STZ'ye bağlı olası hipoglisemik ölümlerini önlemek için gece boyunca %5 glukoz solüsyonu bırakılmıştır. STZ/NA enjeksiyonundan 1 hafta sonra kuyruktan intravenöz (i.v.) yolla alınan kan örneklerinde açlık kan glukozu ölçülmüştür. Açlık kan glukozu 200 mg/dl (11.1 mmol/l)'den yüksek olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. DM'nin belirlendiği gün itibari ile 4 hafta boyunca sürecek olan tedavi süreci başlamıştır (Hashish ve Abd El-Kader, 2019; Othman ve ark., 2017). EMPA

grubuna T2DM'nin belirlendiği günden başlanarak (STZ uygulamasından 1 hafta sonra) 28 gün boyunca peroral olarak EMPA (10 mg/kg) uygulanırken DAPA grubuna ise aynı şekilde T2DM'nin belirlendiği günden itibaren 28 gün boyunca peroral olarak DAPA (1 mg/kg) uygulanmıştır. Çalışmanın tasarımına ait şekil aşağıda gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Çalışmanın tasarımı

5.2.3. Kan glukoz düzeylerinin takibi

Tüm deney gruplarında 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerde kan glukoz ölçümü hayvanın kuyruk veninden alınan kanla glukometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar not edilmiştir.

5.2.4. Hayvanların vücut ağırlıklarının ölçülmesi

Modelin oluşturulduğu gün deneye başlamadan önce ve deney süresince haftalık olarak sıçanların vücut ağırlıkları ölçülerek not edilmiştir.

5.2.5. Oral glukoz tolerans testi (OGTT)

OGTT deneyin 23. gününde gerçekleştirilmiştir. OGTT'den önce hayvanlar 12 saat boyunca aç bırakılarak su alımlarının serbest olması sağlanmıştır. 12 saatlik açlık sonunda tedaviler her zamanki gibi oral olarak uygulanmış ve tedavi uygulamasından 30 dakika sonra sıçanlara 2

g/10 ml/kg dozda hazırlanan glukoz çözeltisi verilmiştir. Gruplardaki tüm hayvanların kan glukoz seviyeleri glukoz yüklemesi sonrası kuyruk veninden alınan kanda 0., 30., 60., 90., ve 120. dakikalarda glukometre ile ölçülerek not edilmiştir.

5.2.6. İnsülin tolerans testi (İTT)

OGTT'den 2 gün sonra deneyin 25. gününde gerçekleştirilmiştir. Test öncesinde hayvanlar 12 saat boyunca aç bırakılmış ancak su alımlarının serbes olması sağlanmıştır. 12 saatlik açlık sonunda tedaviler her zamanki gibi uygulanmış ve tedavi uygulamasından 30 dakika sonra sıçanlara i.p. olarak insülin (1 U/kg dozunda) enjeksiyonu yapılmıştır. Gruplardaki tüm hayvanların kan glukoz seviyeleri insülin uygulaması sonrası kuyruk veninden alınan kanda 0., 30., 60., 90., ve 120. dakikalarda glukometre ile ölçülerek elde edilen sonuçlar not edilmiştir.

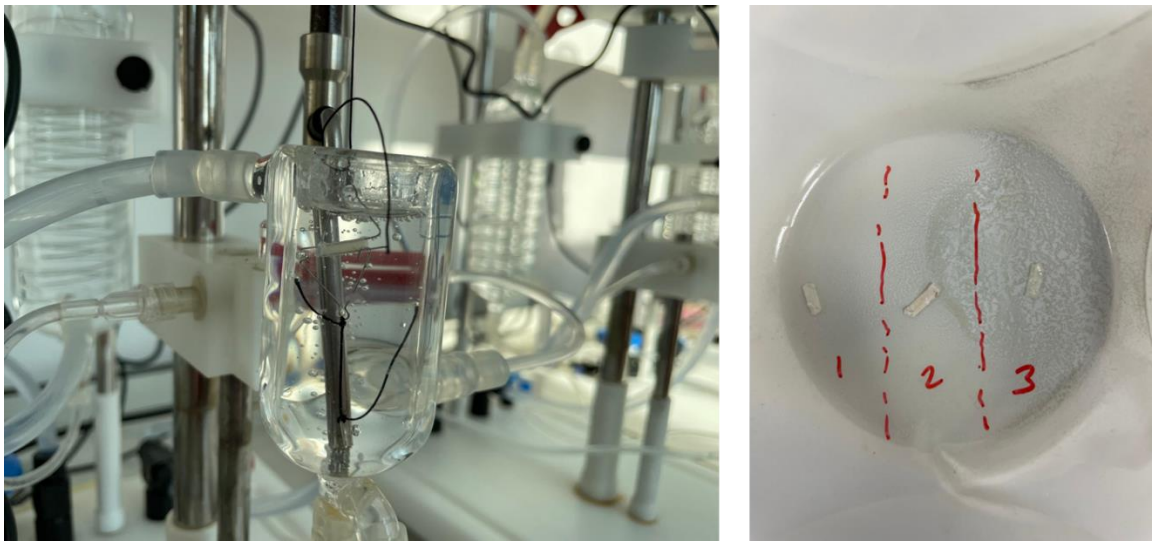
5.2.7. Deney hayvanlarının sakrifiye edilmesi ve örneklerin alınması

28 günlük tedavi sonunda sakrifikasyon için gerekli cerrahi malzemeler ve temiz ortam sağlanarak dokuların ve serumların muhafaza edileceği sarf malzemeler organize edilmiştir. Dokuların çıkarılması süresince buzla çalışılması ve doku ve serumların saklanması için gerekli envanterlerin üzerlerine notların alınması çalışmanın önemli bir ayağını oluşturmuştur. Her bir sıçandan serum, kalp dokusu ve torasik aorta örnekleri alınmıştır. Kalp dokusu alınırken aynı zamanda hızlı bir şekilde tüm kalbin ağırlığı da tartılmıştır ve kalp dokusu hem biyokimyasal hem de histolojik analizler için uygun olacak şekilde uygun muhafaza koşulları ile altında alınmıştır. Kalbin sol ventrikülü miRNA analizleri için çıkarıldığında -80 ^{o}C'de saklanmak üzere RNAlater içeren çözeltide muhafaza edilmiştir. Böylece miRNA analizlere kadar RNA yapısının korunması sağlanmıştır. Bir kısım doku biyokimyasal analiz için ayrılırken geriye kalan kısmı ise %10'luk formaldehite alınarak histolojik çalışmalarda kullanılmak üzere ayrılmıştır. Torasik aorta çıkartılırken aynı şekilde oldukça özenli davranılmış, var ise eğer yağ dokuları aortadan uzaklaştırılarak tartımları alınmıştır. Aorta örnekleri de histolojik analizler için %10'luk formaldehite alınarak saklanmıştır.

5.2.8. Torasik aortada izole organ banyosu çalışması

Sakrifikasyondan hemen sonra torasik aorta yukarıda belirtildiği şekliyle özenli bir şekilde çıkartılmış ve organ banyosunda asana kadar krebs çözeltisinde daha önceden mum eritilmiş petri kabında bekletilmiştir. Aort halkaları, %95 oksijen ve %5 karbon dioksit ile havalandırılan, 37 °C'de sıcaklık koşullarına sahip ayrı organ banyolarında Krebs-Henseleit

çözeltisi içinde ip ile gerilerek kancalara asılmıştır. Bilgisayarda kalibrasyon yapılmış ve ardından öngerilim yükleri hazırlanmıştır. Sonrasında aortalar dinlenme gerilimi altında 60 dakika dengelemede 3 kez yıkanmıştır. Organ banyosu için daha önceden KCl çözeltisi (80 mM) ve logaritmik seyreltme ile 10^{-8}M'dan başlayarak, $3x10^{-8}$, 10^{-7}, $3x10^{-7}$,....., 10^{-4}M'a kadar seyreltilen fenilefrin (FE) çözeltisi hazırlanmıştır. Kontrol grubunda kümülatif olarak FE'nin oluşturduğu kasılmalara bakılmıştır. $3x10^{-5}$M'dan sonra aynı miktarda kasılma gerçekleştirdiği gözlemlenniş ve Kontrol grubundan elde edilen bu veri doğrultusunda bundan sonraki gruplarda direkt olarak $3x10^{-5}$M dozun bir alt dozu olan 10^{-6}M FE submaksimal doz olarak seçilmiş ve bu şekilde dokulara uygulanmıştır. Yanıtlar MP35 Biopac Systems tarafından kaydedilmiştir.



Şekil 7. İzole organ banyosuna asılmış torasik aorta görüntüsü

5.2.9. ELİSA analizlerinin yapılması

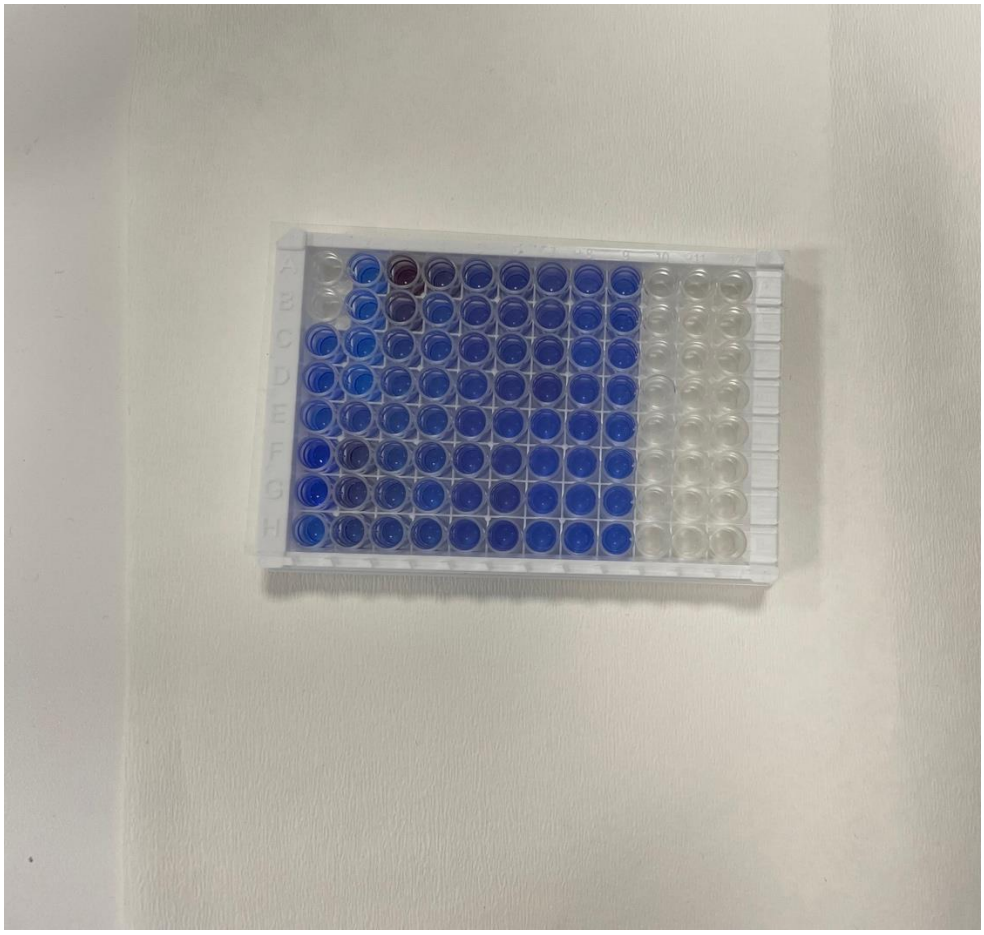
Kardiyak troponin I (kTnI), Süperoksit Dismutaz (SOD), ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (İGÜR, RAGE) ve interlökin-1β (IL-1β) ELİSA ile çalışılmıştır. ELİSA analizleri üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir.

kTnI; kalbe özgü kas liflerinde bulunan proteinlerdir, kardiyak hasar durumunda kandaki seviyeleri artmaktadır.

SOD; oksidatif stres durumunda arttığı bilinen antioksidan enzim grubudur. DM'de serbest radikaller oldukça artmakta ve buna bağlı olarak DM'li hastalarda SOD seviyeleri de yükselmektedir.

İGÜR; DM'nin komplikasyonlarında önemli role sahip olan ileri glikasyon son ürünlerinin reseptörü olarak rol alır ve kronik hiperglisemi durumunda bu reseptörün ekspreyonu artmaktadır.

IL-1β; dokularda ve hücrelerin çoğundan yer alan güçlü proenflamatuvar mediyatördür. Kardiyovasküler komplikasyonlarda ve diyabette IL-1β seviyeleri oldukça artmaktadır (Peiro ve ark., 2017).



Şekil 8. ELİSA analizleri sırasında kuyucukların görüntüsü.

5.2.10. miRNA gen ekspresyon analizi

5.2.10.1. Total RNA izolasyonu

miRNA analizleri için dekapitasyon esnasında sol kalp dokusundan 50 mg örnekler alınmış ve bu örnekler deney gününe kadar RNA later solüsyonu içerisinde -80 °C de saklanmıştır. Total RNA izolasyonunu sağlamak amacıyla dokular iki aşamalı olacak şekilde homojenize edilir. İlk aşamada daha iri parçalara ayrılırken sonrası aşamada içinde lysis buffer solüsyonu bulunan DNaz-RNaz içermeyen seramik boncuklu tüplere kalp dokusu konularak homojenize edilmiştir. Çalışmalar esnasında hep soğuk ortam sağlanır ve buz üzerinde çalışılmıştır. Trizol reaktifi kullanılarak homojenleştirilmiş kalpten total RNA izole edilir. Total RNA'ların miktarı ve saflığı, NanoDrop ND-100 spektrofotometre tayin edilerek not edilir.



Şekil 9. Total RNA izolasyonu esnasında kullanılan cihazlar.

5.2.10.2. cDNA sentezi ve Real Time PCR analizi

Total RNA izolasyonu yapılırken her bir örneğin saflık ve miktarları not edilmiştir. Konsantrasyonun saflığını gösteren A260 ve A260:280 oranına göre seyreltme yapılarak hepsinin konsantrasyonu dengelenir. RT-PCR amplifikasyonlarına geçiş yapabilmek için önce gen dizilerini DNA'ya dönüştürmek gerekir bu nedenle seçilen miRNA genlerinin ters

transkripsiyon kiti ile elde edilen cDNA sentezi yapılır. RT-PCR amplifikasyonları, BIORAD-CFX96 Touch Real-Time PCR Tespit Sistemine sahip miRCURY LNA SYBER Green PCR Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Termal döngü koşulları şu şekilde programlanmıştır: 2 dakika boyunca 95 °C, ardından 95 °C'de 10 saniye ve primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması (Annealing) için 60 °C'de 60 saniye. Her bir örnek iki tekrarlı olarak çalışılmış ve housekeeping geni (endojen kontrol (ΔCT)) olarak sıçan U6 geni seçilmiştir. Seçilen miRNA'lara ait primer dizileri Tablo 7'de verilmiştir. Real time PCR'den elde edilen sonuçlardan yola çıkarak gen ekspresyonundaki rölatif değişikliklerin hesaplanmasında Livak'ın delta delta CT (ΔΔCt) metodu kullanılmıştır. Örnekler, U6 ekspresyonu kullanılarak standardize edilir (ΔCt), standardize edilen örneklerin rölatif kantifikasyonu 2^(ΔΔCt) formülüne göre hesaplanmıştır.

Tablo 7. Seçilen miRNA'lar ve primer dizileri.

miRNA	**İleri dizi (İ)/Geri dizi (G)**
U6	**İ:** 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' **G:** 5'-AACGCT TCACGAATTTGCGT-3'
rno-miR-133a	**İ:** 5'-TGCTTTGCTAGAGCTGGTAAAATG-3' **G:** 5'-AGCTACAGCTGGTTGAAGGG-3'
rno-miR-34a	**İ:** 5'- CTCGCCGCGCTCTACCTACCTA-3' **G:** 5'- ATGAGCCATTCGCAGTTTCACTGTA-3'
rno-miR-221	**İ:** 5'- CCAGTTTATCTATCCGACCTTC-3' **G:**5'-CTTTCTTGCGGTCCTTTC-3'
rno-miR-21	**İ:** 5'-CAT TGT GGG TTT TGA AAA GGT TA-3' **G:** 5'-CCA CGA CTA GAG GCT GAC TTA GA-3'
rno-miR-144	**İ:** 5'-GGCCCTGGCTGGGATATCAT-3' **G:** 5'-GGTGCCCGGACTAGTACATC-3'
rno-miR-146	**İ:** 5'-TAGACCTGGTACTAGGAAGCAGCTGCAT-3' **G:** 5'-GAGTAGCAGCAGCAGCAAGAGAGACTT-3'
rno-miR-9	**İ:** 5'-CGGAGATCT TTTCTCTCTTCACCCTC-3' **G:** 5'-CAAGAATTC GCCCGAACCAGTGAG-3'
rno-miR-373	**İ:** 5′-GTAGCAGGATGGCCCTAGAC-3′ **G:** 5′-CGCCCTCTGAACCTTCTCTT-3′
rno-miR-22	**İ:** 5'-GTAGGTACCGAAGGAAAAGGCATGGATTTCAGTCC-3' **G:** 5'-GCAGCTAGCAGGGGGAGCAAATCACTGCGTCC-3'
rno-miR-223	**İ:** 5′-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3′ **G:** 5′-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'

5.2.11. Histopatolojik analiz

Işık mikroskobik analizler için kasetlere yerleştirilen kalp dokusu ve aort örnekleri %10 formaldehit içerisinde tespit edildikten sonra rutin histolojik doku işlemlerine tabi tutulmuştur (LEICA TP1020, WETZLAR, Almanya). Daha detaylı ifade edilecek olursa doku numuneleri alkol serisiyle dehidre edilip ksilende şeffaflaştırılmıştır. Ardından doku gömme merkezi (LEICA EG1150H+C, WETZLAR, Almanya) kullanılarak parafin mumuna gömülmüştür. Doku blokları, döner bir mikrotom (Leica RM2125RT, WETZLAR, Almanya) kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler halinde kesildikten sonra histolojik gözlemler için örnekler Hematoksilen ve Eozin (H&E) ile boyanmıştır. Mikroskobik incelemeler ×100 ve ×400 büyütmede (Olympus BX-51, Japonya) yapılmış ve ışık mikroskobu (Olympus DP-72, Japonya)' na takılan dijital kamera (ABD) kullanılarak fotoğraflanmıştır. Ardından tüm gruplarda, hasarı değerlendirmek amacıyla inflamatuar hücre infiltrasyonu, fibrozis ve kas hücrelerinin düzensizliği puanlanmıştır.

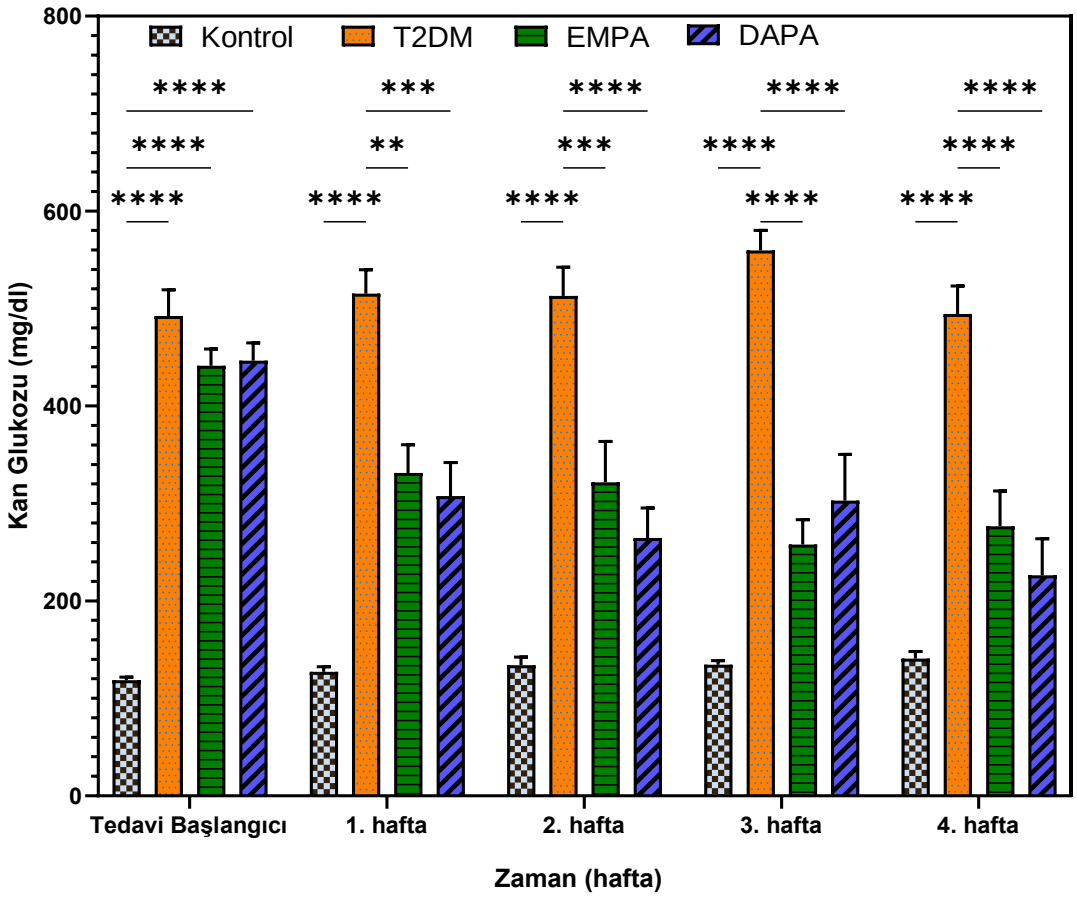
5.2.12. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi

Deneylerden elde edilen tüm verilerin istatistik değerlendirmelerine Graphpad Prism 9 istatistik programı kullanılarak ulaşılmıştır. Analiz sonuçları ortalamanın standart ortalama hatası ya da sapması olarak değerlendirilmiştir. Gruplar arası değerlendirmeler tek yönlü veya iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılarak hesaplanmıştır. $p<0,05$ olduğu zaman istatistiksel olarak anlamlılık var kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

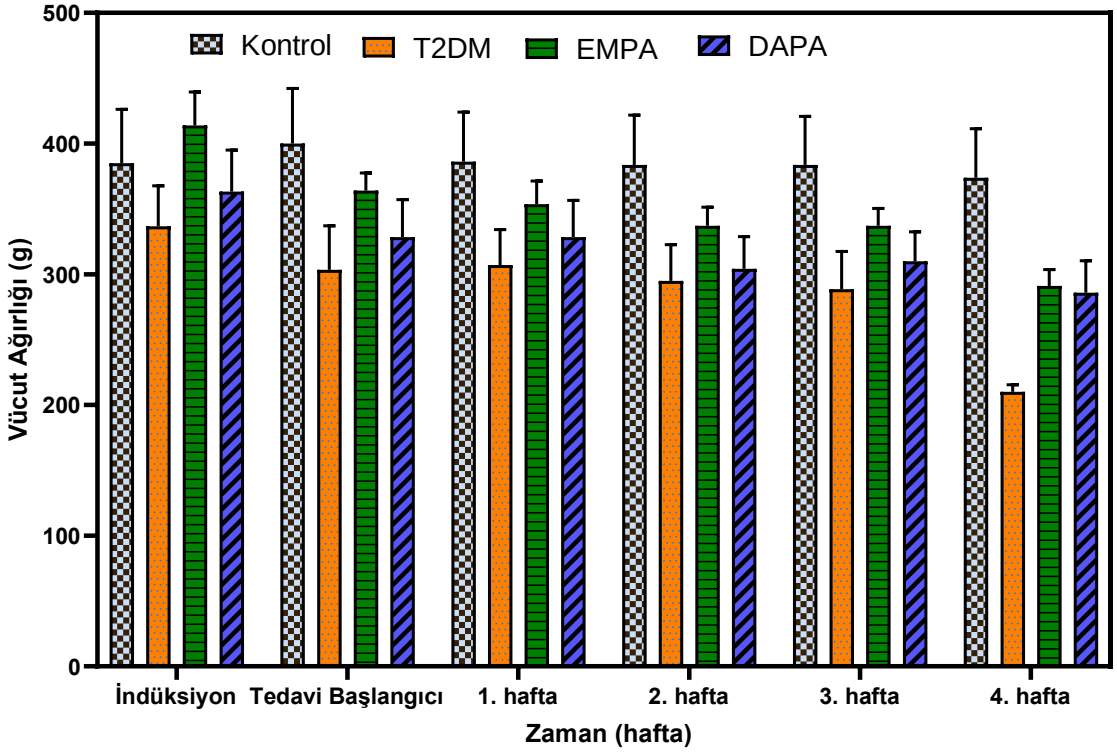
6.1. Kan Glukoz Düzeyi ve Vücut Ağırlıklarının Takibi

T2DM indüksiyonundan 1 hafta sonra tedavilerin uygulanmaya başladığı gün 0. gün olarak kabul edilmiştir. 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerde hayvanların kan glukozu kuyruk veninden alınan kan ile ölçülmüştür (Şekil 10). Kan glukoz düzeyinin gruplar arasındaki farklılıklarına bakıldığı zaman 0. haftadan itibaren kan glukozunun tedavi gruplarında anlamlı oranda azalma gösterdiği bulunmuştur. 0. hafta ile 4. hafta kan glukoz düzeyleri kıyaslandığında Kontrol ve T2DM grubunda anlamlı değişiklik olmazken EMPA grubunda (**p<0,01) ve DAPA grubunda (****p<0,0001) anlamlı oranda azalma olmuştur. 3. ve 4. haftada gruplar arasındaki kan glukoz düzeyleri kıyaslandığında EMPA ve DAPA gruplarında kan glukoz düzeyleri T2DM grubuna kıyasla anlamlı oranda azalmıştır (****p<0,0001).



Şekil 10. Tüm gruplarda haftalık kan glukoz düzeylerinin değerlendirilmesi. T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup.

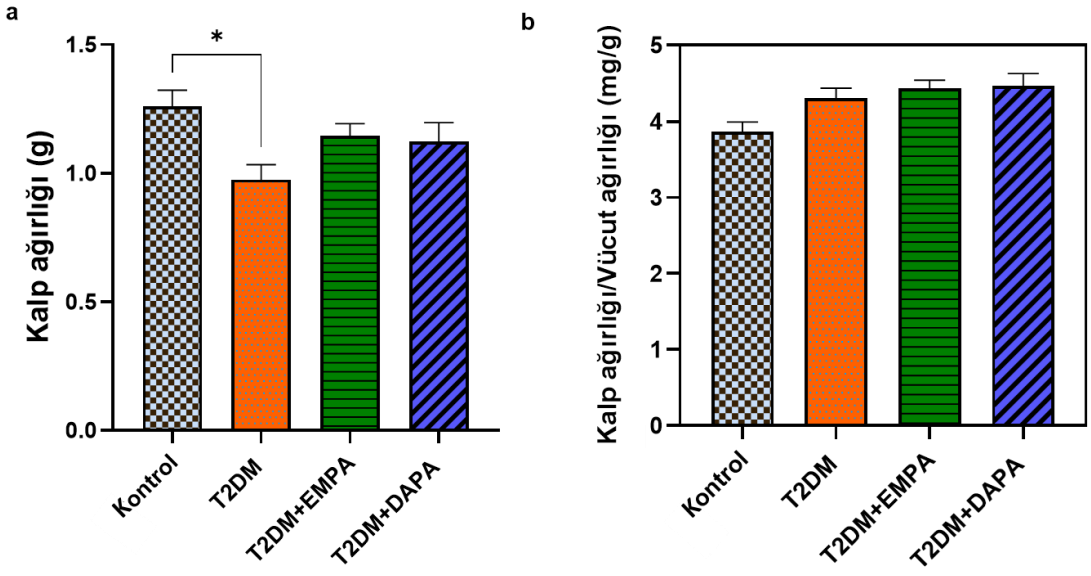
T2DM indüksiyonundan önce STZ ve NA uygulama dozunu belirlemek amacıyla ve takibinde indüksiyondan 1 hafta sonra tedavilerin uygulanmaya başladığı günden itibaren deney sonlandırılana kadar hayvanların vücut ağırlıkları haftalık olarak ölçülmüştür (Şekil 11). İndüksiyon gününde gruplar arasında vücut ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık yoktur. İlerleyen deney haftalarında Kontrol grubu mevcut ağırlığında anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Ancak T2DM, EMPA ve DAPA gruplarında vücut ağırlıkları özellikle deneyin son haftası olmak üzere deney süresince oldukça azalmıştır. Hayvan gruplarının popülasyona uygunluk açısından dişi ve erkek olarak karma planlanması nedeniyle bu azalmada istatistiksel anlamlılık yakalanılamadığı düşünülmektedir.



Şekil 11. Tüm gruplarda haftalık vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi. T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus ; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup

Dekapitasyon sonrasında kalp ağırlıkları tartılmıştır (Şekil 12a). Tartımlardan elde edilen veriler analiz edildiğinde T2DM grubunun kalp ağırlığı Kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda azalmıştır (*p<0,05). T2DM grubunun kalp ağırlığı tedavi gruplarına göre azalmış olsa da tedavi grupları ve T2DM grubu kıyaslandığında istatistiksel anlamlılık bulunmamaktadır. Kalp

ağırlığının dekapitasyon günü alınan vücut ağırlıklarına oranına bakıldığında gruplar arasında bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 12b).

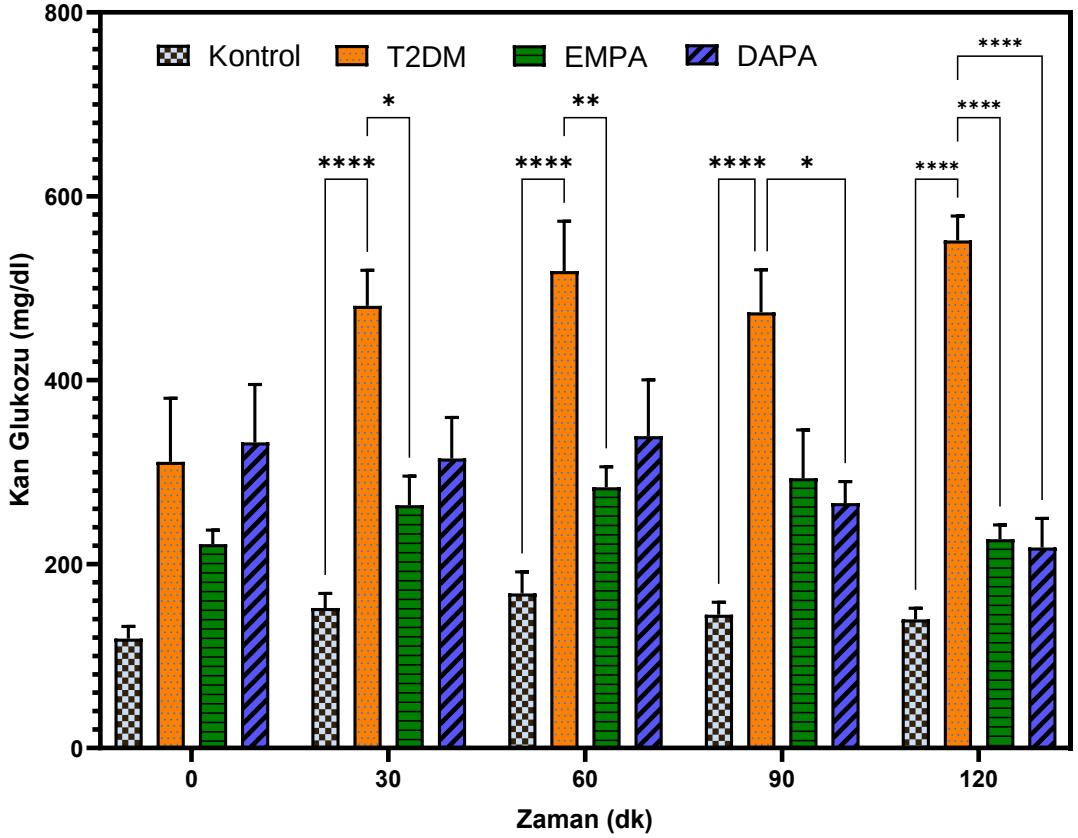


Şekil 12. Tüm gruplarda a) kalp ağırlığının değerlendirilmesi, b) %kalp ağırlığı/vücut ağırlığının değerlendirilmesi. T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup

6.2. OGTT ve İTT Analizlerinin Sonuçları

OGTT verilerine dair sonuçlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil 13). Kontrol grubunun kan glukozunun 60. dakikada yüksek seviyelere ulaştığı ancak farklı zaman dilimleri arasında Kontrol grubunda anlamlı bir farklılık bulunmadığı gösterilmiştir. T2DM grubunun kan glukoz düzeyleri glukoz uygulamasını takiben yükselmeye başlamıştır. T2DM grubunun kan glukozundaki yükselme 0. dakikadan ve 60. dakikaya ulaşıldığında anlamlı oranda artmıştır (*p<0,5). 120. dakikaya ulaşıldığında T2DM grubunun kan glukoz seviyeleri 0. dakikaya kıyasla artışını anlamlı oranda devam ettirmiştir (**p<0,01). EMPA grubunun kan glukozundaki artış incelendiğinde 60. dakikada kan glukoz düzeylerinin EMPA grubu için yüksek olduğu söylenebilir. Ancak farklı zaman dilimlerinde EMPA grubundaki kan glukoz düzeyi arasındaki farklılık istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. DAPA grubunun kan glukozundaki artış incelendiğinde 60. dakikada kan glukoz düzeylerinin DAPA grubu için yüksek olduğu söylenebilir. Ancak farklı zaman dilimlerinde DAPA grubundaki kan glukoz

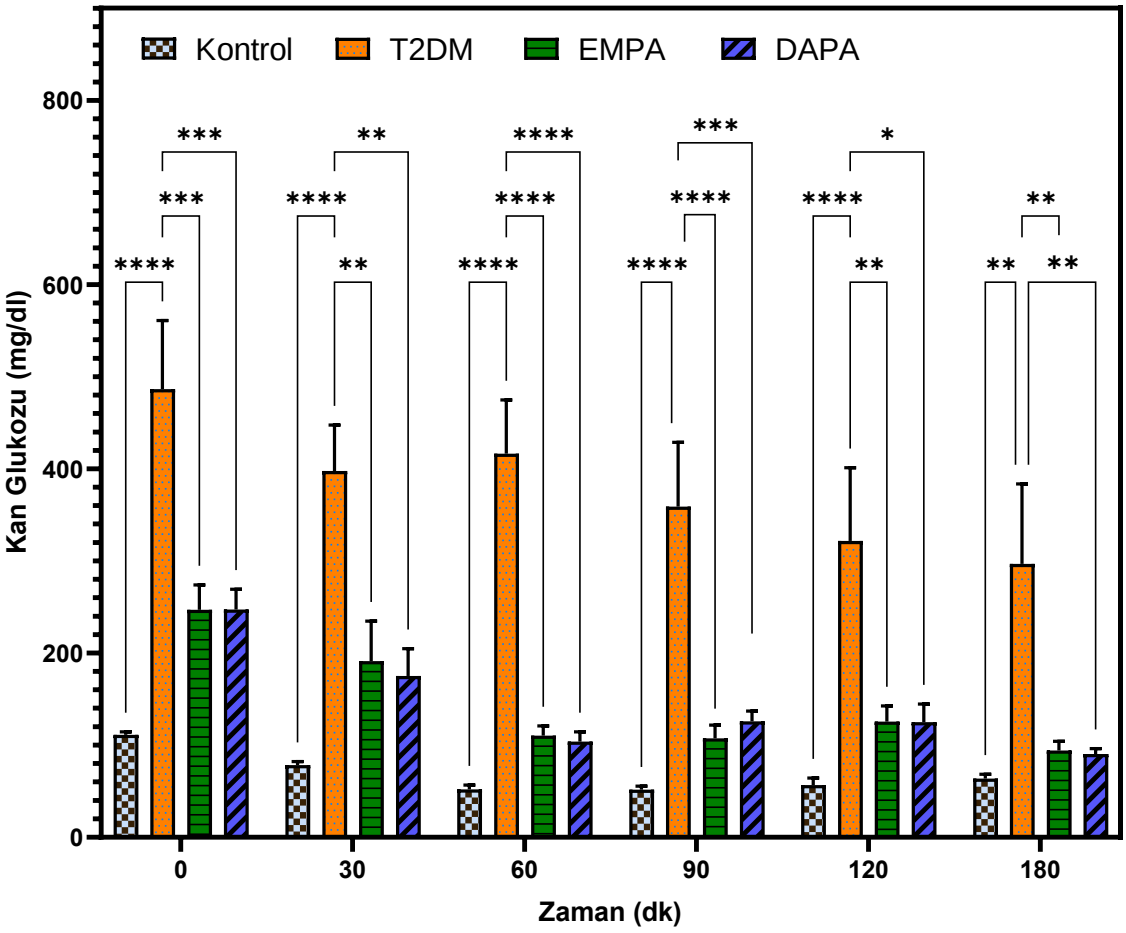
düzeyi arasındaki farklılık istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Aynı dakikalarda gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar Şekil 13'de gösterilmiştir. 90. dakikada DAPA grubunda kan glukozu T2DM grubuna kıyasla anlamlı azalma gösterirken EMPA grubunda aynı dakikada istatistiksel azalma bulunmamıştır (*p<0,5). 120. dakikada T2DM grubunun kan glukoz seviyeleri diğer üç gruba kıyasla anlamlı oranda artmıştır (****p<0,0001)



Şekil 13. Tüm gruplarda OGTT sonuçlarının değerlendirilmesi. T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus ; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup; OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi.

İTT sonuçları deri altı insülin enjeksiyonundan sonra Kontrol, EMPA ve DAPA gruplarının T2DM grubundaki sıçanlara göre insülinden daha fazla yararlandığını göstermiştir (Şekil 14). T2DM ve tedavi grupları arasındaki anlamlı farklılıklar da tedavilerin insülin kullanımını artırdığını gösterir. EMPA ve DAPA gruplarında 180. dakikada kan glukozu T2DM grubuna kıyasla anlamlı oranda daha azdır (**p<0,01). Ayrıca T2DM grubunun 0. dakikadan itibaren 180. dakikaya kadar kan glukozu düzeylerinde küçük miktarda azalmalar gözlense de hiçbir

zaman diliminde kan glukoz düzeyi arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 14). Bu durum T2DM grubundaki sıçanların insüline duyarlılık geliştirmiş olduğunu ve insülinin kullanılamadığını ortaya koymaktadır.

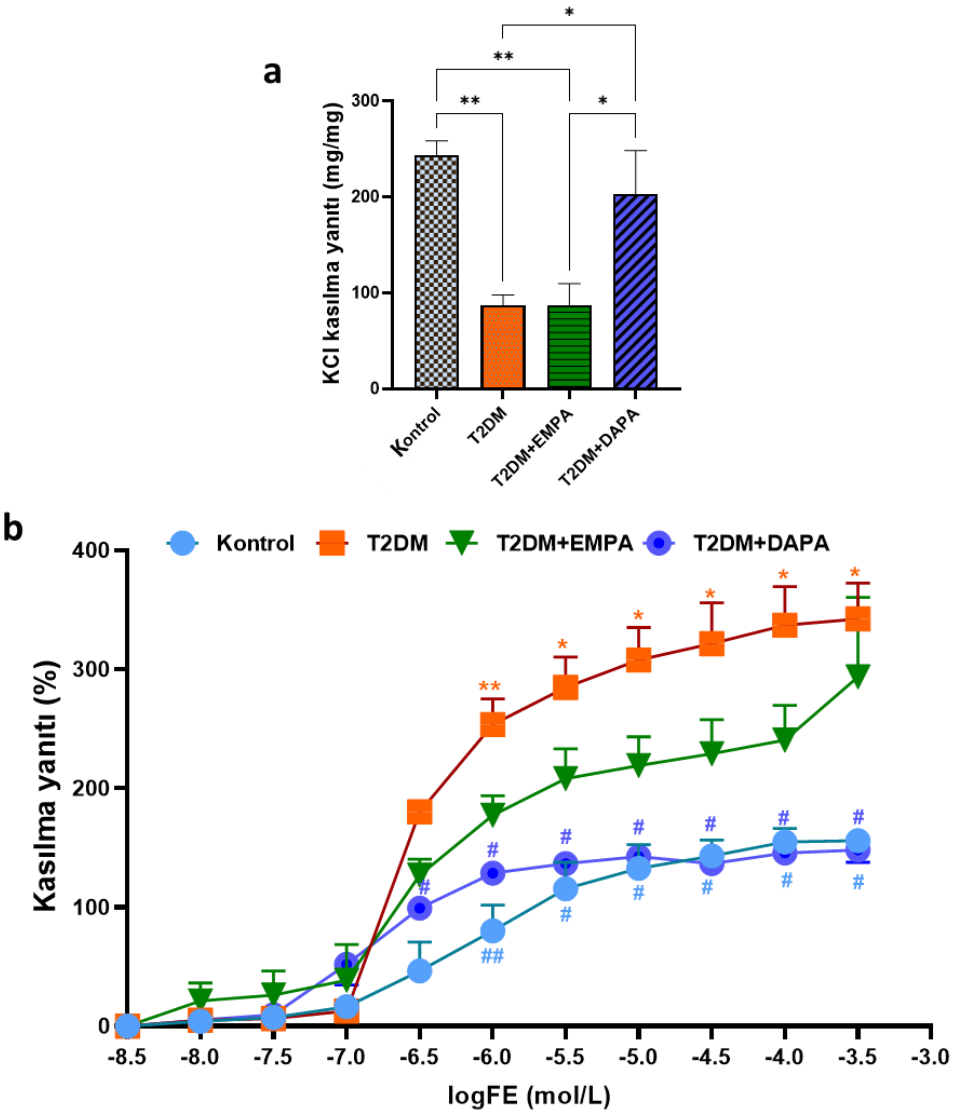


Şekil 14. Tüm gruplarda İTT sonuçlarının değerlendirilmesi. T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus ; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup; İTT: İnsülin Tolerans Testi.

6.3. Torasik Aortada İzole Organ Banyosu Çalışmasının Sonuçları

İzole organ banyosunda torasik aortaların kasılma yanıtlarına dair sonuçlar Şekil 15'te gösterilmiştir. Vasküler endotel fonksiyon, izole organ banyosu çalışmaları kullanılarak aort halkalarında *ex vivo* olarak değerlendirilmiştir. 80 mM KCl kasılması sonucuna göre T2DM ve EMPA grubunda kontrol grubuna kıyasla torasik aorta kasılmasında azalma olduğu görüldü (**p<0,01) (Şekil 15a). T2DM'li sıçanların aorta yanıtları incelendiğinde Kontrol grubuna kıyasla aorta kasılması, bir alfa1-adrenerjik agonisti olan FE'nin yüksek konsantrasyonlarında

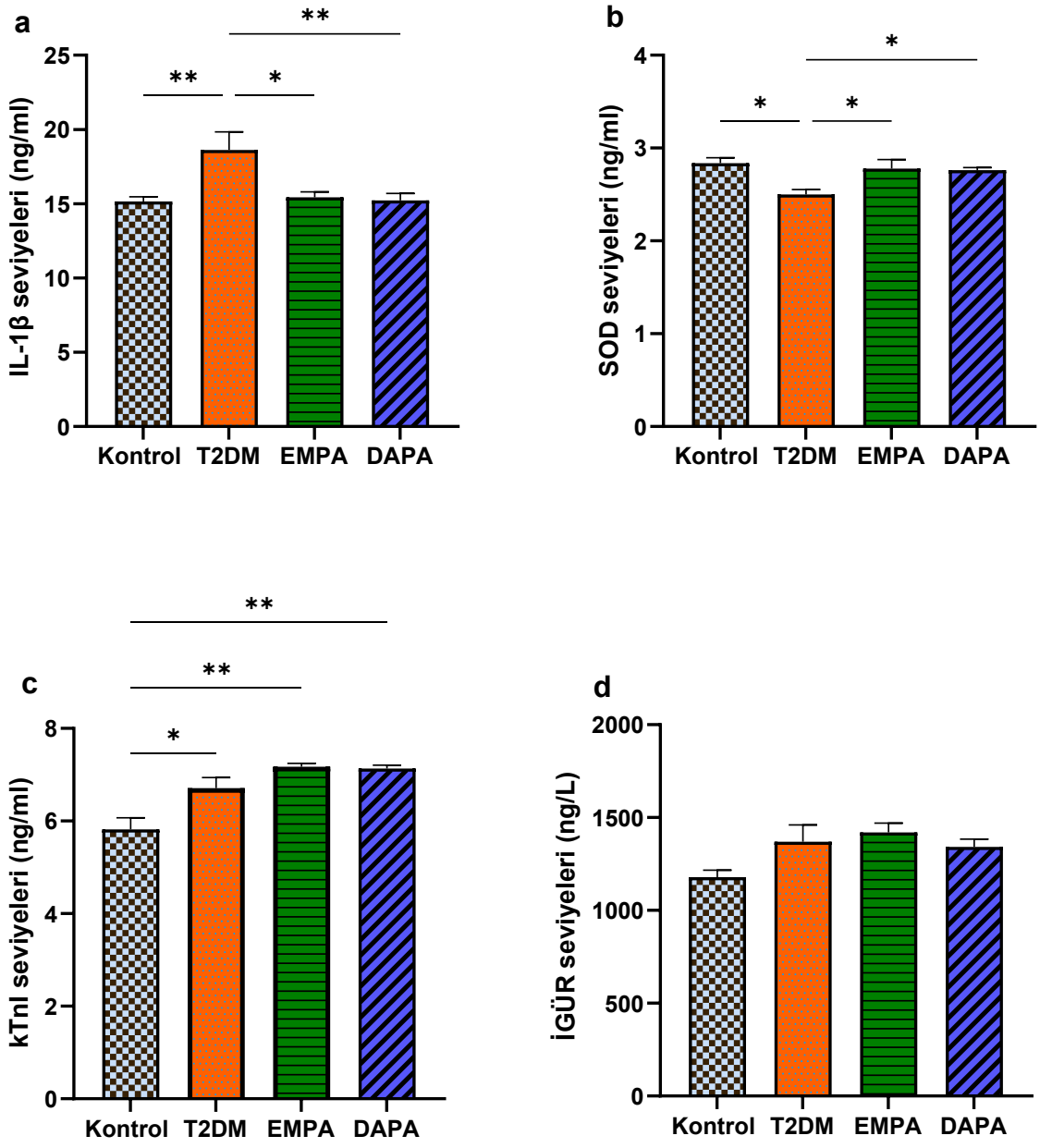
artış göstermiştir ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 15b). EMPA grubunda da benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. DAPA grubunun artan farklı FE konsantrasyonlarına karşı kasılma tepkisi, kontrol grubuna benzer bir profil göstermektedir. DAPA grubu ile T2DM grubu arasında farklı FE konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardır (*p<0,05).



Şekil 15. Tüm gruplarda torasik aortada izole organ banyosu sonuçlarının değerlendirilmesi. T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus ; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Kontrol; #p<0.05, ##p<0.01 vs T2DM).

6.4. ELİSA Analizlerinin Sonuçları

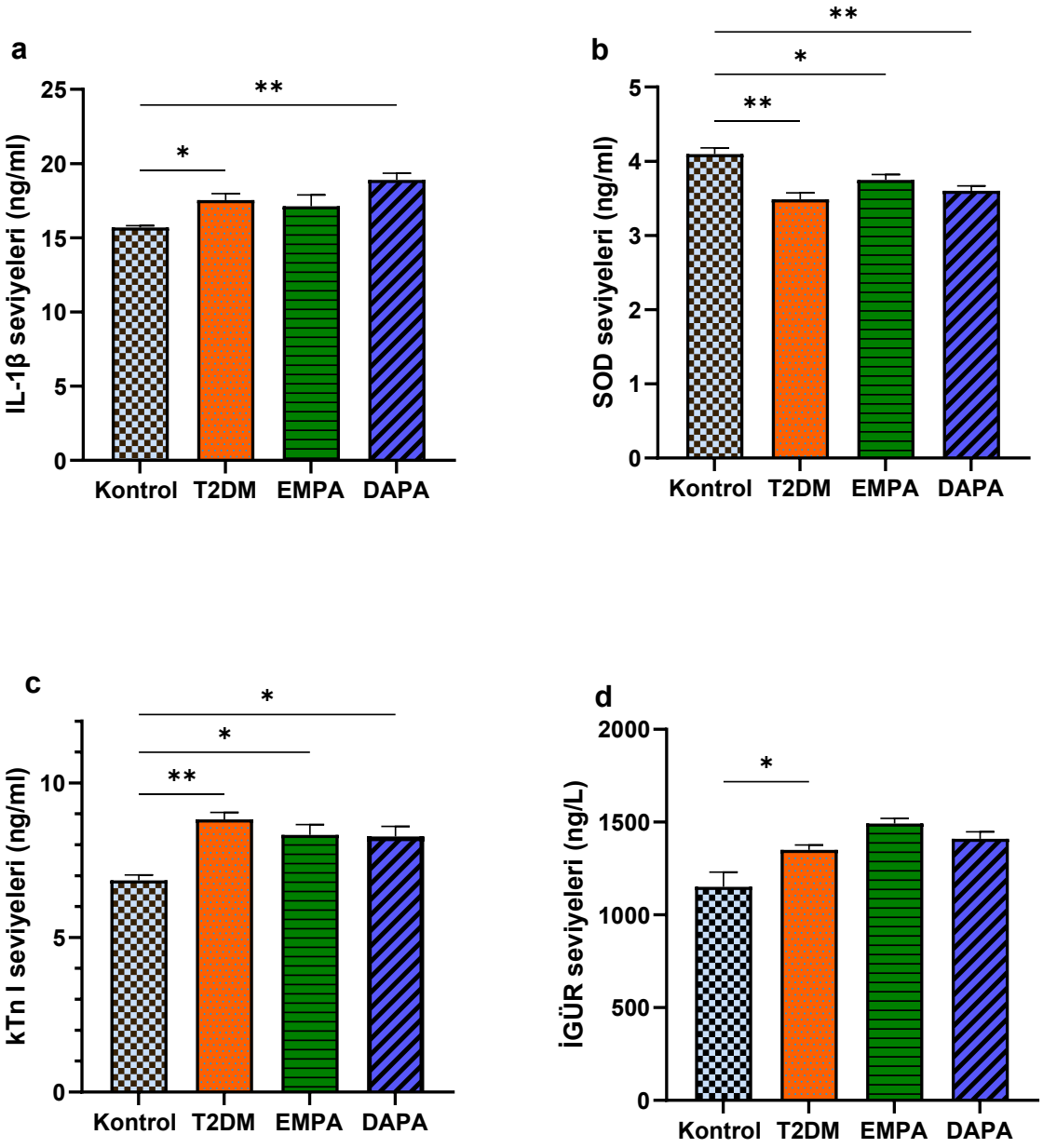
ELİSA analizlerine dair sonuçlar Şekil 16 ve Şekil 17'de gösterilmiştir. Sıçanların serum ve kalp dokusu örneklerinde IL-1β, SOD, kTnI, İGÜR seviyeleri incelenmiştir. Serum IL-1β değerleri T2DM grubunda diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı oranda artmıştır. T2DM grubuna kıyasla EMPA (*p<0,05) grubu ve DAPA (**p<0,01) grubunda istatistiksel anlamlılıkta azalmıştır (Şekil 16a). Serum SOD seviyeleri T2DM grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı oranda azalmıştır (*p<0,05). EMPA ve DAPA gruplarında serum SOD seviyelerinin artışı antioksidan etkinliğin bu ilaçlar tarafından artırıldığını göstermektedir (Şekil 16b). SOD seviyelerinde Kontrol grubu ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılık yoktur. Tüm gruplarda serum kTnI seviyeleri araştırılmıştır (Şekil 16c). Kontrol grubuna kıyasla T2DM (*p<0,05), EMPA (**p<0,01) ve DAPA (**p<0,01) gruplarında serum kTnI seviyeleri artmıştır. Tüm gruplarda kTnI seviyeleri karşılaştırıldığında T2DM ve tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Serum İGÜR seviyeleri sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir farlılık bulunmamıştır (Şekil 16d). T2DM ve EMPA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir artıştan bahsedilebilir.



Şekil 16. Tüm gruplarda serum örneklerinde a) IL-1β, b) SOD, c) kTnI ve d) İGÜR seviyelerinin ELİSA analizleri ile değerlendirilmesi. T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus ; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup; IL-1β: interlökin-1β; SOD: Süper Oksit Dismutaz; kTnI: kardiyak troponin I; İGÜR: ileri glikasyon son ürünleri reseptörü.

Sıçanların kalp dokusunda ELİSA analizleri ile araştırılan IL-1β, SOD, kTnI ve İGÜR seviyelerine dair sonuçlar Şekil 17'de gösterilmiştir. Kalp dokusunda IL-1β sonuçları değerlendirilecek olursa T2DM (*p<0,05) ve DAPA (**p<0,01) grubunda IL-1β seviyeleri

Kontrol grubuna kıyasla artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. EMPA ve Kontrol grubu arasında kalp dokusunda IL-1β seviyeleri açısından anlamlı farklılık bulunmamaktadır (Şekil 17a). Kalp dokusu SOD seviyeleri sonuçlarına göre Kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda SOD seviyeleri azalmıştır. T2DM (**p<0,01), EMPA (*p<0,05) ve DAPA (**p<0,01) gruplarında SOD seviyeleri Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmıştır. T2DM, DAPA ve EMPA grupları arasında ise anlamlı farklılıklar bulunmamıştır (Şekil 17b). Kalp dokusunda kTnI seviyelerinin değerlendirilmesi sonucunda T2DM (**p<0,01), EMPA (*p<0,05) ve DAPA (*p<0,05) grupları Kontrol grubuna kıyasla kTnI seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. T2DM grubunda tedavi gruplarına kıyasla kTnI seviyeleri daha fazladır ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 17c). Kalp dokusunda İGÜR seviyelerinin değerlendirilmesinden bahsedilecek olursak T2DM grubu Kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir atış göstermiştir (*p<0,05). EMPA ve DAPA grupları ise ne Kontrol ne de T2DM gruplarına kıyasla anlamlı farklılık göstermemiştir (Şekil 17d).

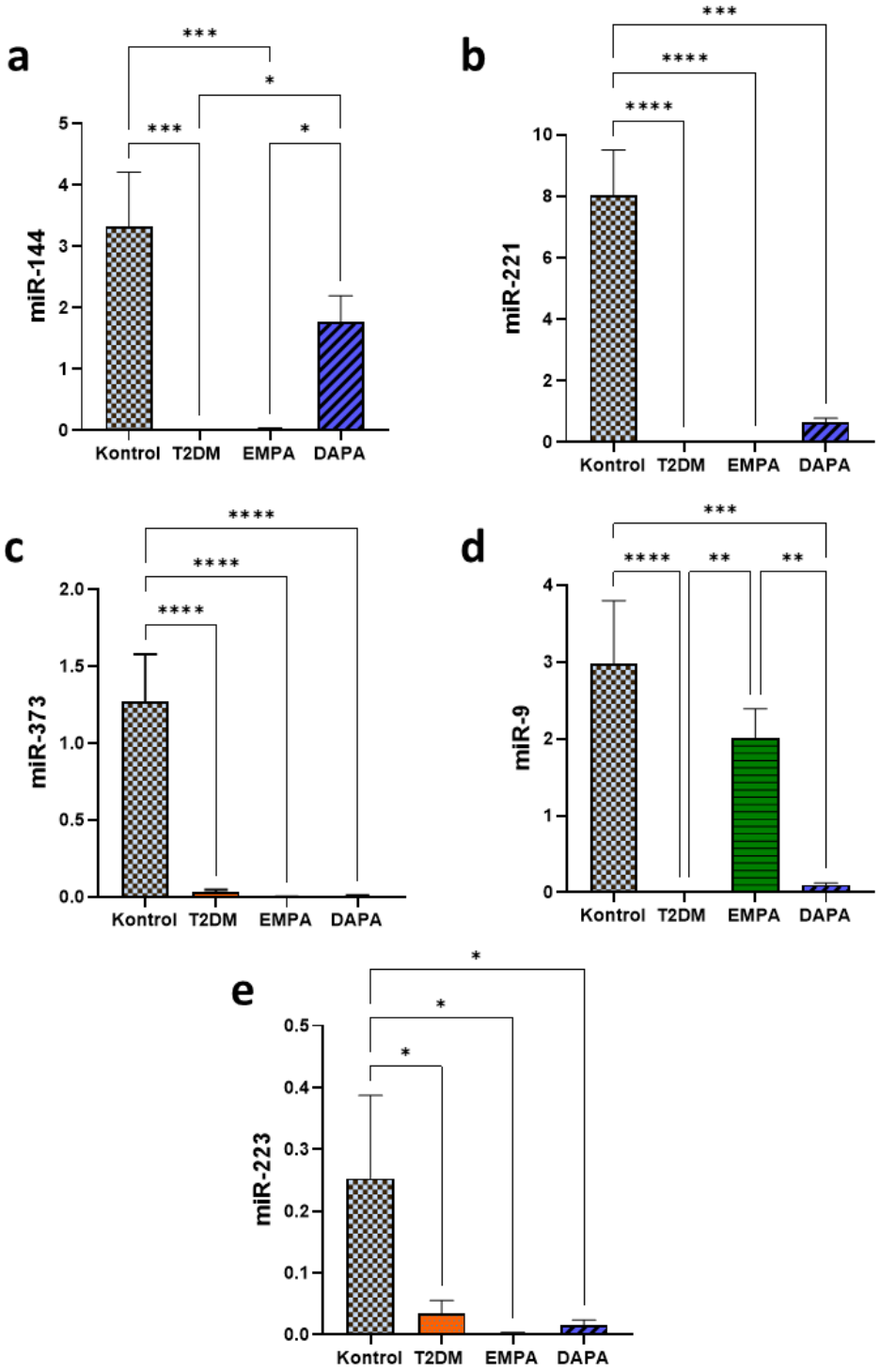


Şekil 17. Tüm gruplarda kalp dokusunda a) IL-1β, b) SOD, c) kTnI ve d) İGÜR seviyelerinin ELİSA analizleri ile değerlendirilmesi. T2DM: Tip 2 Diyabetes Mellitus ; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup; IL-1β: interlökin-1β; SOD: Süper Oksit Dismutaz; kTnI: kardiyak troponin I; İGÜR: ileri glikasyon son ürünleri reseptörü.

6.5. miRNA Analizlerinin Sonuçları

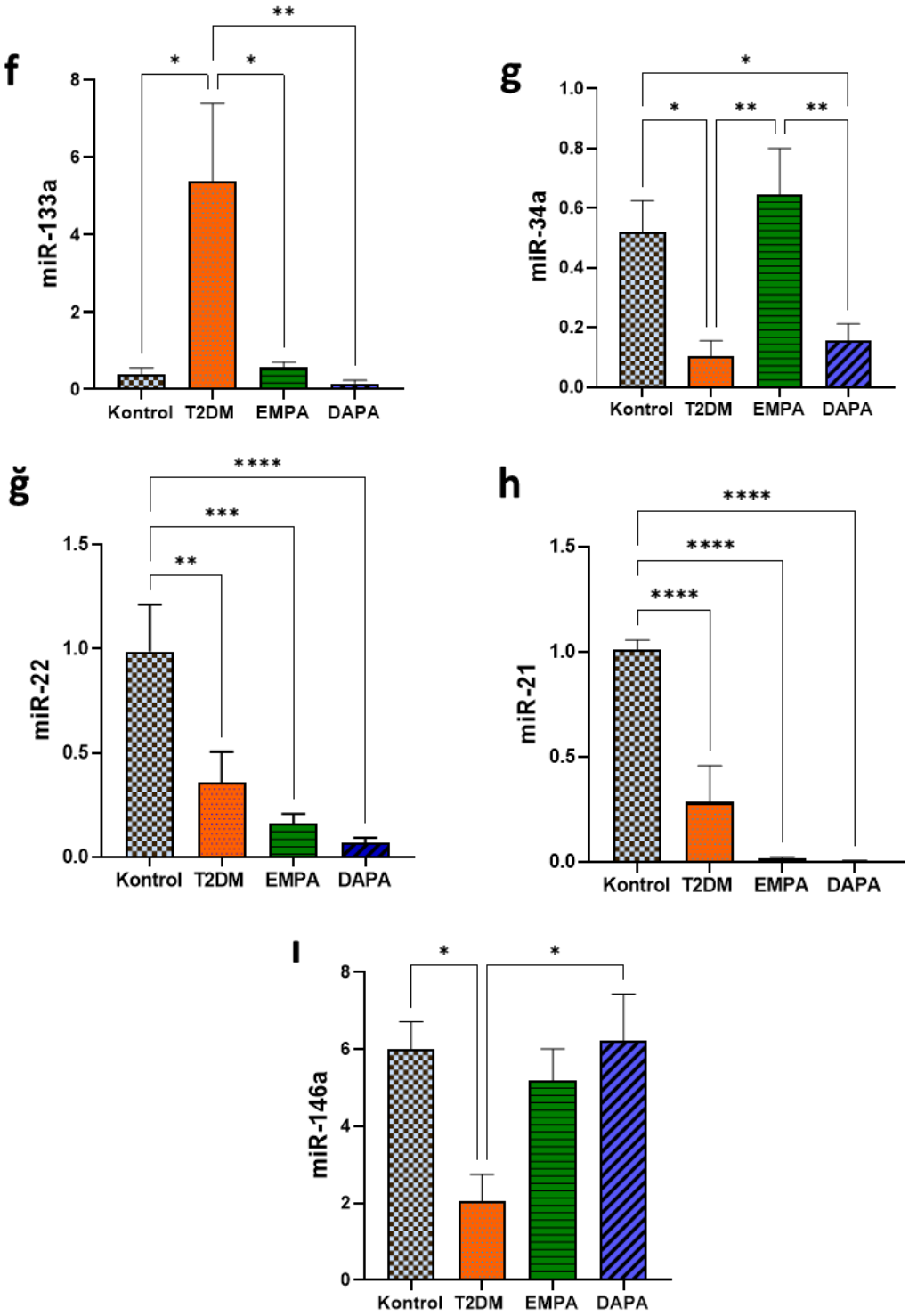
miRNA ekspresyon farklılıklarını incelemek amacıyla yaptığımız RT-PCR çalışmalarının sonuçları Şekil 18'de gösterilmektedir. miR-144, miR-221, miR-373, miR-9, miR-223, miR-133a, miR-34a, miR-22, miR-21 ve miR-146a ifadeleri kalp dokularında gerçek zamanlı PCR ile doğrulanmıştır. miR-144'ün kalp dokusunda tüm gruplardaki ifadesi incelendiğinde Kontrol ve DAPA gruplarında T2DM ve EMPA gruplarına kıyasla daha fazla ifade edildiği bulunmuştur. DAPA grubunda miR-144 ifadesi T2DM ve EMPA gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda artmıştır (*p<0,05). T2DM grubunda miR-144 ifadesi Kontrol (***p<0,001) ve DAPA (*p<0,05) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmıştır. T2DM ve EMPA grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır (*p<0,05) (Şekil 18a). miR-221 ekspresyonları tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında Kontrol grubu dışındaki diğer gruplarda azalmıştır. T2DM (****p<0,0001), EMPA (****p<0,0001) ve DAPA (***p<0,001) gruplarında saptanan miR-144 ifadesindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 18b). miR-373 ekspresyonları tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında Kontrol grubu dışındaki diğer gruplarda azalmıştır. T2DM, EMPA ve DAPA gruplarında saptanan miR-373 ifadesindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (****p<0,0001) (Şekil 18c). miR-9 ifadelerindeki sonuçlara gelecek olursak Kontrol grubuna kıyasla T2DM ve DAPA grubunda anlamlı oranda bir azalma mevcuttur. Kontrol grubu ve EMPA grupları arasında istatiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. EMPA grubu Kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermezken T2DM ve DAPA gruplarına kıyasla miR-9 ekspresyonunda anlamlı bir artış sergilemiştir (**p<0,01). Sonuç olarak EMPA grubu DAPA grubuna göre daha yüksek miR-9 ekspresyonu göstermiştir (**p<0,01) (Şekil 18d). miR-223 ekspresyonları tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında Kontrol grubu dışındaki diğer gruplarda azalmıştır. T2DM, EMPA ve DAPA gruplarında saptanan miR-223 ifadesindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (*p<0,05) (Şekil 18e). miR-133a ekspresyonu kalp dokusunda T2DM grubunda Kontrol grubuna kıyasla artmıştır (**p<0.01). EMPA (*p<0,05) ve DAPA (**p<0,01) gruplarında da miR-133a ekspresyonu Kontrol grubunda olduğu gibi T2DM grubuna kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 18f). miR-34a sonuçlarını değerlendirecek olursak T2DM ve DAPA gruplarında Kontrol ve EMPA gruplarına kıyasla miR-34a ekspresyonunda bir azalma mevcuttur. Kontrol grubuna kıyasla T2DM (*p<0,05) ve DAPA (*p<0,05) gruplarının ekspresyonları istatistiksel anlamlılıkta azalmıştır. Yine EMPA grubu T2DM ve DAPA grupları ile karşılaştırıldığında T2DM ve DAPA gruplarının miR-34a

ekspresyonlarının EMPA'ya kıyasla daha az olduğu bulunmuştur (**p<0,01) (Şekil 18g). miR-22 ekspresyonu tüm gruplarda karşılaştırıldığında Kontrol grubuna kıyasla T2DM (**p<0,01), EMPA (***p<0,001) ve DAPA (****p<0,0001) gruplarında azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 18ğ). miR-21 ekspresyonunda gerçekleşen değişiklikler değerlendirildiğinde Kontrol grubuna kıyasla T2DM, EMPA ve DAPA gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır (****p<0,0001) (Şekil 18h). Son olarak miR-146a sonuçlarına göre T2DM grubunda miR-146a'nın ekspresyonu diğer gruplara kıyasla azalmıştır. Kontrol (*p<0,05) ve DAPA (*p<0,05) grubuna kıyasla T2DM grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (Şekil 18ı).



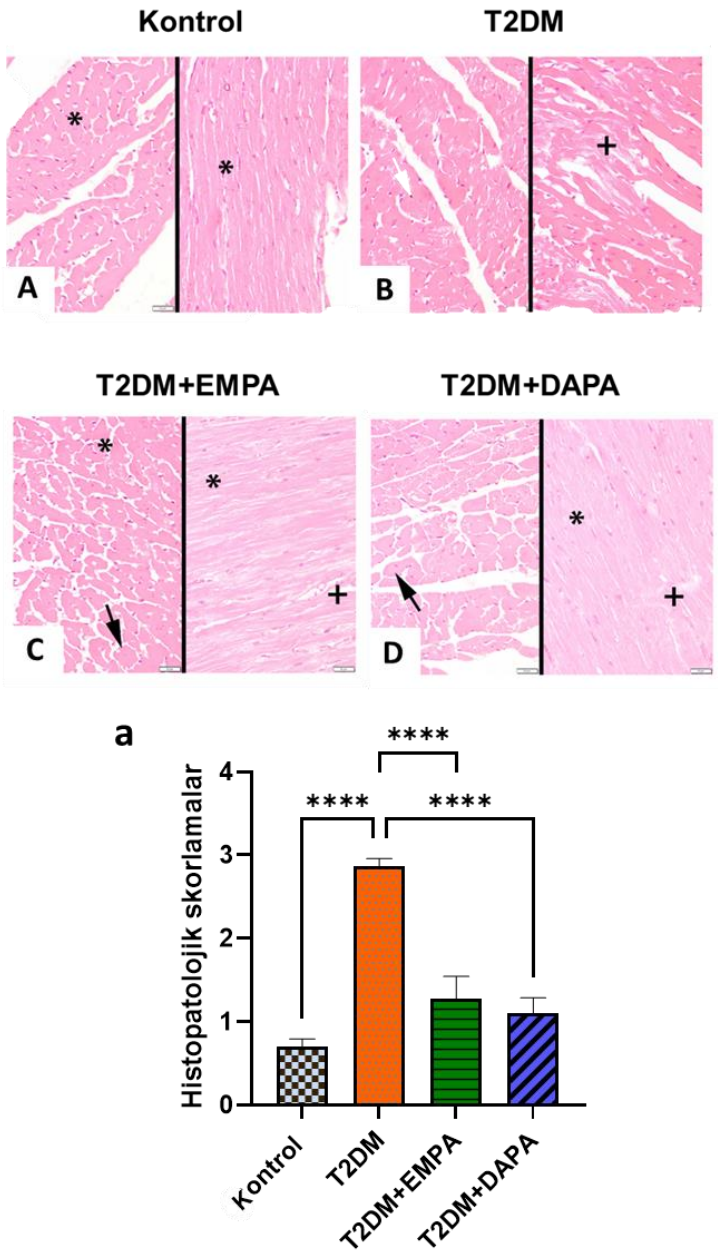
Şekil 18. Tüm gruplarda kalp dokusunda a) miR-144, b) miR-221, c) miR-373, d) miR-9, e) miR-223, f) miR-133a, g) miR-34a, ğ) miR-22, h) miR-21, ı) miR-146a ekspresyonlarının RT-PCR analizi ile değerlendirilmesi. Tip 2 Diyabetes Mellitus ; EMPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Empagliflozin tedavisi uygulanan grup; DAPA: Tip 2 Diyabetes Mellitus+Dapagliflozin tedavisi uygulanan grup.

Şekil 18 devamı.



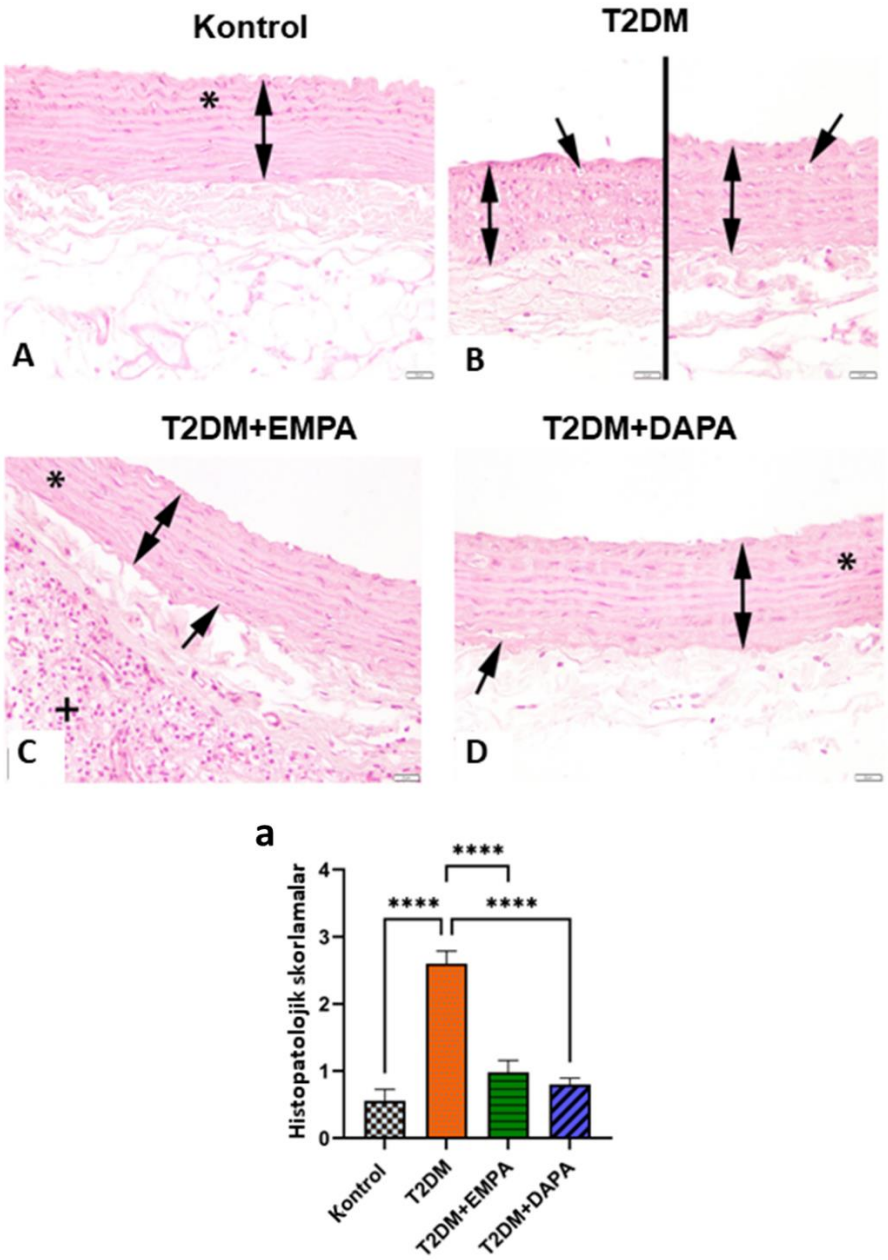
6.6. Histopatolojik Analizler

Kalp dokusuna ait histopatolojik analizlerin sonuçları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 19). Bu sonuçlara bakıldığında Kontrol grubunun kardiyak miyofibrillerinin düzenli dağıldığı ve kardiyomiyositlerin oval, tek ve merkezi yerleşimli çekirdeklere sahip olduğu görülmüştür (Şekil 19A). Ancak T2DM grubunda kardiyomiyosit çekirdeklerinin boyut ve şekillerinde deformasyon ve miyofibrillerin düzensiz bir dağılımda yerleştiği görülmüştür (Şekil 19B). EMPA ve DAPA gruplarının yapısı incelendiğinde morfolojik olarak kontrol grubuyla benzer morfolojik yapıya sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 19C ve 19D). Tüm gruplarda, kalpteki hasarı araştırmak amacıyla inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrozis ve kas hücrelerinin düzensizliği skorlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre kalp hasarı kıyaslandığında T2DM grubuna ait kalp dokularında Kontrol, EMPA ve DAPA gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek skor elde edilmiştir (****$p<0,0001$) (Şekil 19,a). Kontrol, EMPA ve DAPA gruplarında ise histopatolojik skor sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.



Şekil 19. Hem çapraz (sol taraf) hem de uzunlamasına (sağ taraf) kesitleri gösteren kalp dokularının açıklayıcı mikrografları. A. Kontrol grubu. B. T2DM grubu. C.T2DM+EMPA grubu. D. T2DM+DAPA grubu. Yıldız işareti (*): Düzenli morfolojiye sahip kalp kasları. Ok (→): Morfolojisi değiştirilmiş hipertrofik kalp kasları. Artı (+): Düzensiz organize olmuş kalp kası lifleri. Hematoksilen ve Eozin boyası. a. Kalp dokusuna ait inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrozis ve kas hücrelerinin düzensizlik skorlaması.

Torasik aorta ait histopatolojik değerlendirme sonuçları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 20). Kontrol grubuna ait torasik aort dokuları sağlam bir epitel tabakası ve normal kalınlıkta tunika medya ile düzenli histolojik dağılım göstermiştir (Şekil 20A). T2DM grubunda epitel tabakasının, elastik liflerin ve kas hücrelerinin değişen organizasyonu ve tunika medyada kalınlık artışı gözlenmiştir (Şekil 20B). Tedavi verilen DAPA ve EMPA gruplarına ait aort örneklerinin genel histolojik özellikleri incelendiğinde Kontrol dokusuna benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Ancak bu gruplarda kısmen de olsa anormal kas hücreleri ve bozulmuş elastik lifler mevcuttur (Şekil 20C ve 20D). Tüm gruplarda, aortadaki hasarı araştırmak amacıyla inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrozis ve kas hücrelerinin düzensizliği skorlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre aort hasarı kıyaslandığında T2DM grubuna ait aort dokularında Kontrol, EMPA ve DAPA gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek skor elde edilmiştir (****$p<0,0001$) (Şekil 20,a). Kontrol, EMPA ve DAPA gruplarında ise histopatolojik skor sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.



Şekil 20. Torasik aort dokularının açıklayıcı mikrografları. A. Kontrol grubu. B. T2DM grubu. C.T2DM+EMPA grubu. D. T2DM+DAPA grubu. Yıldız işareti (*): Düzenli morfolojiye sahip elastik dokular. Çift taraflı ok: Tunika medya. Ok: Morfolojisi değiştirilmiş hipertrofik/dejenere kas hücreleri. Artı (+): Tunika adventisyasında inflamatuar hücre infiltrasyonu. Hematoksilen ve Eozin boyası. a. Torasik aortaya ait inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrozis ve kas hücrelerinin düzensizlik skorlaması.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

T2DM hastalığı ve buna bağlı gelişen komplikasyonlar günümüzde ve yakın gelecekte toplum sağlığını ciddi tehdit altına sokan ve bilim dünyası tarafından çalışmaların yoğunlaştığı bir hastalıktır. Bu hastalıkta beslenme şekilleri ve yaşam tarzlarındaki değişikliklerle birlikte, DM'den etkilenen kişi sayısı artmakta ve hastalığın mekanizmasının da anlaşılması zorlaşmaktadır. YG seviyelerine maruz kalan vücutta doku ve hücre fonksiyonları bir süre sonra bozulmakta; inflamasyon, ROS ve apoptoz gibi biyolojik süreçler birçok doku ve organı makro ve mikro düzeyde etkilemektedir. Çalışmamızda T2DM hastalığına bağlı olarak gelişen ve mortalite oranı oldukça yüksek olan KVO ile ilişkili olarak T2DM'li sıçanlarda kalp dokusu incelenmiştir.

Literatürde T2DM'de gelişen KVO'da SGLT2 inhibitörlerinin kalpte koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu koruyucu etkiler için pek çok mekanizma öngörülmüş olmasına rağmen, SGLT2 inhibitörlerinin serum glukoz seviyesini etkilemeden kardiyoprotektif etkilerini nasıl gösterdikleri hala tam olarak netlik kazanamamıştır (Shao ve ark., 2019). EMPA ve DAPA arasındaki mekanizma farklılıkları ve birbirlerine olan üstünlüklerine dair veriler kısıtlıdır. 2000'li yılların başında keşfedilen miRNA'lar birden fazla hedef mRNA'nın ekspresyonunu kontrol edebilir ve her bir mRNA birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir. Ayrıca miRNA'lar birden fazla hedef gene de sahiptir. Birçok biyolojik fonksiyonda hayati roller taşıyan miRNA ekspresyonlarının T2DM, kardiyak olaylar ve kanser gibi çoğu hastalıkta değiştiği gösterilmiştir (Natalicchio ve ark., 2023). Hastalıkların patofizyolojisinde yer alan hemen hemen çoğu yolakta bu ekspresyonlardaki değişikliklerin sebep olduğu durumlar bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında incelenen miRNA'lar DM durumunda kalpte ekspresyonu değişen miRNA'lar arasından literatür taramaları sonucunda seçilmiştir. Bütün bu soru işaretlerinin oluşturduğu merakla çalışmanın amacı; EMPA ve DAPA'nın diyabetik kalpteki koruyucu etki mekanizmalarına dair bilgi eksikliğini aydınlatmaya ek olarak STZ/NA ile indüklenen sıçan kalp dokusunda miRNA ekspresyonları üzerine EMPA ve DAPA'nın etkilerini açıklığa kavuşturmaktır. Literatürde, EMPA ve DAPA üzerinde yapılmış pek çok çalışma olmasına rağmen T2DM'ye bağlı kardiyovasküler komplikasyonlarda EMPA ve DAPA'nın miRNA ifadeleri üzerindeki etkileri ilk kez araştırılmıştır.

T2DM için şu anda mevcut olan hayvan modelleri arasında, KK/Ay, db/db ve ob/ob fareleri, ZFD ve OLETF sıçanları gibi çeşitli türler vardır ve kalıtsal hiperglisemi ve insülin direnci sergileyerek deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu modellerin üretiminin zor ve nispeten pahalı oluşu, hayvanlar için uygun ortamların sağlanmasıyla ilgili sorunlar ve insülin direncinin çok hızlı ilerlemesi nedeniyle farmakolojik araştırmalarda kullanıma uygun farklı modellere ihtiyaç duyulmuştur. STZ/NA indüklü T2DM modeli bu amaçla geliştirilmiş önemli modellerden biridir (Tahara ve ark., 2011). Çalışmamızda kullanılan bu model ile sıçanların deney süreci boyunca elde edilen vücut ağırlığı, kan glukozu, OGTT ve İTT sonuçları ile doku ve serum örneklerinden elde edilen biyokimyasal ve histolojik sonuçlar incelendiğinde T2DM modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğu görülmektedir.

SGLT2 inhibitörleri T2DM tedavisinde klinikte kullanımları olan önemli ilaçlardır. Haftalık kan glukozu takibi ve vücut ağırlığı sonuçlarımız incelendiğinde T2DM sıçanlara kıyasla kan glukoz düzeylerinin EMPA ve DAPA gruplarında kontrol altına alındığı ve vücut ağırlıklarının da tedavi gruplarında korunduğu bulunmuştur. DM hastalığında glukoz hücre tarafından yeteri kadar kullanılamadığı için protein ve yağ molekülleri kullanılmakta, bu durum da vücut ağırlığındaki azalmaların ana nedenini oluşturmaktadır. Vücut ağırlığı ve kan glukozuna dair sonuçlarımızın literatürde aynı modeldeki T2DM grupları ile uyumlu olduğu saptanmıştır (Othman ve ark., 2017).

Kardiyak fonksiyonel biyobelirteçler (kTnI vb.) ve hemodinamik parametreler (kalp ağırlığı, kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranı, tansiyon vb.) kalp hasarını tespit etmede hayati öneme sahip araçlar olarak kabul edilmektedir. Kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranındaki artış, kardiyomiyopati gibi kardiyovasküler hasarlarda bir gösterge olan kardiyak hipertrofinin ana özelliğidir (Yanucil ve ark., 2022). Çalışmamızın sonuçlarına göre T2DM grubundaki sıçanlarda kalp ağırlığının Kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuşturr. STZ indüklü DM çalışmalarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde de kalp ağırlığının STZ grubunda Kontrole kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Shukla ve ark., 2017). Bu çalışmada kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranı ve kTnI sonuçları incelendiğinde; STZ/NA uygulanan sıçanlarda kalp hasarının meydana geldiği görülmüştür. Genel olarak daha önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. EMPA ve DAPA gruplarında vücut ağırlığının azalması ve histopatolojik incelemede kalp dokusunda düzenli olarak dağılım gösteren kardiyomiyositlerin atriyal yeniden şekillenme ve antihipertansif etkilerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2021).

Kan glukozunun tolere edilebilirliğini değerlendirmek amacı ile yapılan OGTT sonuçlarımıza göre T2DM grubunun kan glukozunun analizin 60. dakikasında hızla yükseldiği ve analizin sonunda 120. dakikada da hala yüksekliğini koruduğu görülmüştür. Kontrol grubu ve tedavi gruplarında ise kan glukozunun kontrol altında olduğu bulunmuştur. Özellikle DAPA grubunda 90. dakika itibariyle kan glukozundaki hızlı bir azalma görülmüştür. OGTT'den elde edilen veriler incelendiğinde EMPA ve DAPA'nın kan glukozunu iyi tolere ettiği gösterilmiştir. T2DM yalnızca hiperglisemi ile ilişkili değil aynı zamanda İR ve hiperinsülinemi ile de ilişkilidir. İTT analizinde insülin uygulamasından sonra kan glukoz düzeyleri ne kadar hızlı düşerse insulin duyarlılığının da o kadar arttığı söylenilmektedir. Çalışmamızda yapılan İTT analizinde T2DM grubu sıçanlarda insülin tedavisi uygulanmasına rağmen insülinin dokularda kullanılamadığı ve tedavi gruplarında insülin yanıtına bağlı olarak kan glukozunun düştüğü gösterilmiştir. T2DM grubunun OGTT ve İTT analizlerine dair sonuçlarının literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (Ablat ve ark., 2017). Bununla birlikte STZ/NA indüklü oluşturulan modelde EMPA ve DAPA etkinliklerinin kıyaslandığı bir çalışma literatürde bulunamamıştır.

DM' de meydana gelen hiperglisemi, hem T1DM hem de T2DM'de endotel disfonksiyonunun temel nedenlerinden birisidir. YG seviyeleri endotel hücrelerinde ve miyositlerde çoklu biyokimyasal değişikliklere yol açmaktadır. Bu modifikasyonlar arasında artmış enzimatik olmayan glikasyon, sorbitol-miyo-inositol aracılı değişiklikler, redoks potansiyeli değişiklikleri ve protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonu yer alır. Hiperglisemi ayrıca endotel hücrelerinde ROS artışına neden olmakta, bu durumda hücrelerin oksidatif stresin üstesinden gelme yeteneğini baskılamaktadır. Diyabetik kalpteki hiperglisemik koşullar, kardiyovasküler endotel hücrelerinde metabolik bozukluklara ve oksidatif strese yol açar; bu durumun da endotelyal geçirgenliğin artması, endotelyal gevşemenin bozulması ve NO kullanılabilirliğinin azalması gibi birçok etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Knapp ve ark., 2019). Dolayısıyla hipergliseminin, damarlarda oksidatif stres ve inflamasyona bağlı olarak endotel disfonksiyon meydana getirmesi nedeniyle çalışmamızda torasik aortanın kasılma yanıtı kümülatif fenilefrin konsantrasyonlarının ölçümü ile değerlendirilmiştir. Önceki çalışmalarda, STZ ile indüklenen sıçanlarda Kontrole kıyasla kasılma yanıtının arttığı bulunmuştur (Sonmez ve ark., 2022). Kumar ve arkadaşları da STZ ile indükledikleri DM modelinde endotel disfonksiyonunu organ banyosu ile değerlendirmişlerdir ve bu çalışmada da STZ indüklü grupta diğer gruplara kıyasla kasılma yanıtının arttığını bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada DAPA'nın endotel

disfonksiyonun artmasını önlediği; antiinflamatuar, antioksidan ve İGÜ birikimini önleyici etkiler göstererek kalbi koruduğu bulunmuştur (Kumar ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda da T2DM grubunda kasılma yanıtının fazla olması literatürdeki sonuçlarla uyumludur. DAPA grubunda T2DM'ye kıyasla aorta dokusunda kasılma yanıtındaki artışın önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Organ banyosundan elde edilen sonuçlara göre DAPA'nın, torasik aortada EMPA'ya kıyasla daha fazla koruyucu etki gösterdiği düşünülmüştür.

T2DM ile ilişkili hipergliseminin, ROS üretiminin artmasına ve kardiyomiyosit apoptozunu indükleyen inflamasyona yol açtığı belirtilmiştir (Sefidgari-Abrasi ve ark., 2020). Çok sayıda bilimsel çalışma; inflamasyon ve oksidatif stresin DM'li bireylerde atriyal yeniden şekillenmeye ve miyokardiyal değişikliklere neden olarak süreci hızlandırdığını göstermektedir. Bu değişikliklerin arasında inflamasyon, antioksidan parametrelerin azalması, hipertrofi, apoptoz, fibrozis ve sertliğin yer aldığı bildirilmiştir (Shao ve ark., 2019; Y. Zhang ve ark., 2021).

Güçlü bir pro-inflamatuar sitokin olan IL-1β seviyeleri, pankreas β hücrelerinde hasarın oluşmasında güçlü bir tetikleyicidir. Ancak IL-1β'nın T2DM patogenezinde rol oynadığı bilinmesine rağmen KVO üzerindeki etkileri hala belirsizdir (Herder ve ark., 2015). Kalp dokusu ve serumda inflamasyonu değerlendirmek amacıyla IL-1β seviyeleri ölçülmüştür. T2DM'li sıçanlarda hem serum hem kalp dokusunda IL-1β seviyelerinin artması oluşturduğumuz kalp hasarında inflamatuar mekanizmanın da rol aldığını göstermektedir. Serumda EMPA grubunun IL-1β seviyeleri DAPA grubuna kıyasla daha fazla iken kalp dokusunda DAPA grubunun IL-1β seviyeleri EMPA'ya kıyasla daha fazla bulunmuştur. Dolayısıyla EMPA'nın kalpteki inflamatuar yanıta karşı daha koruyucu olduğu ancak vücutta genel olarak inflamatuar yanıtı o kadar baskılayamadığı söylenilebilir.

YG seviyelerinin neden olduğu ROS ve İR'nin, T2DM'nin patogenezinde yer alan oksidatif streste önemli bir rol oynadığı ve oksidatif stresi artırdığı bildirilmiştir (Sefidgari-Abrasi ve ark., 2020). SOD, oksidatif stres durumunda arttığı bilinen süperoksit radikallerini süpüren antioksidan enzim grubudur (Bugga ve ark., 2022). SOD, oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltarak kardiyak apoptozun azaltılmasında önemli bir rol oynar (Guo ve ark., 2023). Kalp dokusu ve serumda oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla SOD seviyeleri ölçülmüştür (Şekil 16b, Şekil17b). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında T2DM grubunda serum ve kalp dokusundaki SOD düzeyleri azalırken, IL-1β düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Çalışmamıza

paralel olarak yapılan bir çalışmada SOD düzeylerinin azalmasının ve IL-1β düzeylerinin artmasının kalp hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Dia ve ark., 2023; Sefidgari-Abrasi ve ark., 2020). DAPA grubunda IL-1β düzeylerinin Kontrol grubuna kıyasla artarken, SOD düzeylerinin ise Kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur. Kalpteki inflamatuvar yanıt ve oksidatif streste DAPA tedavisinin EMPA tedavisi kadar etkili olamadığı görülmüştür. Önceki çalışmalarda EMPA ve DAPA'nın kalpteki koruyucu etkilerinin STAT-3 ve PI3K'nın aktivasyonuna bağımlı olduğu bulunmuştur. Fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) kardiyomiyosit-fibroblast iletişiminde rol alırken, kaveolin-3 (Cav-3) ise STAT-3'ün yukarı yönde düzenlenmesindeki rolü ile kalpte koruyucu etki sağlayan medyatörlerdir. EMPA ve DAPA'nın FGF-2 ve Cav-3 isimli bu iki medyatörün düzenlenmesini sağlayarak STAT-3 ve PI3K aktivasyonunda yer almaları yeni keşfedilen ortak mekanizmalardan biridir. Ancak aynı çalışmada EMPA'nın ilginç bir şekilde DAPA'dan farklı olarak mitokondriyal kompleks I ve II'nin solunum kapasitesini arttırdığı bulunmuştur. Bu nedenle de EMPA ve DAPA'nın kalpteki koruyucu etkilerinin altında yatan farklı mekanizmaların aydınlatılması literatürde önem taşımaktadır (Nikolaou ve ark., 2022). EMPA ve DAPA'nın etkinlik farkı ile ilgili mekanizmalara dair kıyaslayıcı daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kalpte miyokardiyal doku hasarı ve miyosit membranında bozulma meydana geldiği zaman aynı oranda kardiyak hasar belirteci olarak bilinen kardiyak troponinler salgılanır. Genelde kardiyak iskemi durumunda bakılan parametreler olsa da DM'de subklinik çalışmalarda myokard hasarında bu belirteçlerin seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Gumede ve ark., 2022). Çalışmamızda STZ ile indüklenen T2DM grubunda kTnI sonuçları literatürle uyumlu olarak Kontrol grubuna kıyasla T2DM grubunda artmıştır (Altamimi ve ark., 2021). Tedavi gruplarında ise T2DM'ye kıyasla kalp dokusunda kTnI seviyelerinin daha az olduğu bulunmuştur. Ayrıca T2DM grubunda literatüre paralel olarak kalp dokusunda myofibril ve mitokondri hasarıyla ilişkili olarak kTnI ve inflamatuvar sitokin IL-1β seviyeleri artarken yine paralel olarak SOD seviyelerinin de azaldığı görülmüştür (Altamimi ve ark., 2021).

İGÜ'ler stabil bir kompleks oluşturmak üzere enzim olmadan glukoz veya diğer indirgeyici şekerlerle kendiliğinden reaksiyona giren amino asit, nükleik asit veya lipitleri ifade ederler. DM durumunda meydana gelen uzun süreli hiperglisemi seviyeleri İGÜ'lerin aşırı birikmesine neden olur ve kolajenin glikozilasyonunu arttırarak İGÜ'lerin çapraz bağlanmasını artırır böylece İGÜ'ler, reseptörleri olan İGÜR'leri ile birleşir. (Hongwei ve ark., 2019). Bununla birlikte İGÜ-İGÜR etkileşimi sonucunda ROS ve inflamatuar yanıt da tetiklenir (Farrag ve ark.,

2023). Çalışmamızda STZ uygulanan sıçanlarda Kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda İGÜR seviyelerinde artış bulunmuştur. Hiperglisemiye bağlı olarak İGÜR seviyelerinin yüksek olması beklenen bir durumdur ve sonuçlar literatürle uyumludur (Hongwei ve ark., 2019). Ayrıca inflamatuar belirteç olan IL-1β seviyelerinin T2DM grubunda fazla olması ve antioksidan enzim SOD seviyelerinin T2DM grubunda az olması da İGÜ-İGÜR etkileşimleri ile açıklanabilir. Bütün bu mekanizmalar birbiri ile iç içe geçmiş kompleks bir mekanizmaya işaret etmektedir.

miRNA'lar, genlerin ekspresyonunu düzenleyerek inflamasyon, apoptoz, proliferasyon ve immün yanıtlar dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçte yer alırlar (Jeyabal ve ark., 2016). Dolayısıyla bu moleküller kardiyovasküler sistemin gelişimi, patogenezi, rejenerasyonu ve onarımı gibi miyokarddaki DM ile ilişkili patofizyolojik süreçlerde hayati öneme sahiptir (Jakubik ve ark., 2021; Kura ve ark., 2020). Ancak miRNA'ların sentezi YG seviyelerinden etkilenir ve kan glukozu normoglisemik koşullara ulaşsa dahi bu olumsuz etki kalıcı olabilir (Kura ve ark., 2020). Bu çalışmada seçilen 10 tane miRNA geninin ekspresyonlarındaki değişiklikler RT-PCR analizi ile tüm gruplarda değerlendirilmiştir. miRNA'lar (miR-223, miR-373, miR-22, miR-9, miR-146a, miR-21, miR-144, miR-221, miR-133a ve miR-34a) literatürde patofizyolojik mekanizmalarda yer aldığı belirtilen miRNA'lar arasından seçilmiştir (Jakubik ve ark., 2021; León ve ark., 2016). Ayrıca bu miRNA'lar T2DM ve kardiyovasküler olaylarda ekspresyonu değişen ve yüksek kan glukoz seviyesinden etkilenen miRNA'lardır (Jakubik ve ark., 2021). Öte yandan literatürde ilk defa EMPA ve DAPA tedavilerinin miRNA ekspresyonları üzerine etkileri çalışmamızda karşılaştırılmıştır ve deney gruplarında çeşitli patofizyolojik mekanizmalarla ilişkili farklı miRNA ekspresyonları bulunmuştur. Bu sonuçlara göre T2DM grubunda miR-144, miR-221, miR-373, miR-9, miR-223, miR-34a, miR-22, miR-21 ve miR-146a ekspresyonlarının azaldığı, miR-133a ekspresyonlarının ise arttığı gösterilmiştir. miRNA sonuçlarını sırasıyla değerlendirecek olursak daha önce yapılan çalışmalarda miR-144'ün yüksek glukoz koşullarına karşı kardiyoprotektif etkiler gösterdiği, oksidatif stresi ve apoptozu önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmada miR-144 ekspresyonları T2DM ve EMPA gruplarında diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalmıştır. Nrf2'nin doğrudan miR-144 tarafından hedeflendiği bildirilmiştir (Jakubik ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2023). Nrf2, glutamat-sistein ligaz, katalitik alt birim, NAD(P)H dehidrojenaz ve kinon 1 (NQO1) dahil olmak üzere artan oksidatif strese hücresel yanıtta önemli olan birden fazla genin aktivasyonu yoluyla antioksidan savunmayı düzenleyen ana transkripsiyon

faktörüdür (Kukoyi ve ark., 2019). DAPA grubunda miR-144 ekspresyonunun Kontrol grubunda olduğu gibi EMPA grubundan fazla olması DAPA'nın Nrf2 ve ilişkili diğer sinyal yolları üzerinde bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

miR-221 ekpsresyonlarının sonuçları incelendiğinde Kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda anlamlı bir azalma bulunmuştur. Literatürde miR-221 ile ilgili çelişkili sonuçlar vardır. miR-221'in DM'li kalpte arttığını gösteren çalışmalar olsa da (Chen ve Zhang, 2021) Zhou ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda miR-221'in iskemik kalp hasarında kardiyomyositleri apoptoza ve inflamasyona karşı koruduğunu, oksijenlenmeyi ve sağkalımı artırdığını göstermişlerdir. Yine aynı çalışmalarda miR-221, benzersiz bir anti-fibrotik profil sergilemesi, yani α-SMA ekspresyonunu ve kollajen sekresyonunu azaltması ile ön plana çıkmıştır. Bütün bunlar kalbin yeniden yapılanmasının iyileştirilmesi ve kardiyak fonksiyonun korunarak kardiyak fibrozisin azalması demektir (Chen ve ark., 2016; Zhou ve ark., 2019). T2DM modeli oluşturulan gruplarımızda Kontrole kıyasla oluşan azalma literatürle uyumludur ayrıca çalışmamızda DAPA grubunun miR-221 ekspresyonu T2DM ve EMPA grubuna kıyasla daha fazla bulunmuştur.

miR-373'ün hedef geni MEF2C'dir. miR-373 ekspresyonu azaldığında miyositlerin boyutunu artırarak hipertrofiye neden olur (Jakubik ve ark., 2021). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda diyabetik kalplerde meydana gelen kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranının yükselmesi ve histoloji sonuçlarımız miR-373 ekspresyonundaki azalmayı destekler niteliktedir.

'4.4.3. T2DM'li kalp dokusunda miRNA'lara neler oluyor?' başlığında da bahsi geçtiği gibi daha önce yapılan çalışmalarda miR-9'un YG maruziyeti ile azaldığı bulunmuştur. miR-9'un ekspresyonundaki azalmanın hedef proteini olan ELAVL1'i artırdığı ve dolayısıyla kaspaz-1'i aktive ederek IL-1β ve kaspaz seviyelerindeki artma ile inflamasyon ve hücre ölümünü başlattığı bildirilmiştir (Jeyabal ve ark., 2016). Bu tez çalışmasındaki miR-9 ekspresyonuyla ilgili bulgularımız ELİSA sonuçlarımızla desteklenmiştir. Kontrol ve EMPA gruplarında kalp dokusunda T2DM ve DAPA grubuna göre daha fazla miR-9 ekspresyonu bulunmuştur ve beklendiği üzere tersi şekilde DAPA grubunun kalp dokusunda IL-1β seviyeleri daha yüksektir. EMPA grubu ve Kontrol grubunun kalp dokusunda IL-1β seviyelerinde istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır.

miR-223 ifadesindeki değişikleri değerlendirecek olursak miR-223, kardiyak hipertrofiyi ve inflamasyonu düzenler ve kardiyak hipertrofisi olan sıçanlarda ekspresyonu azalır (M.-W.

Zhang ve ark., 2021). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, miR-223-3p'nin iki fazlı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Kalp hipertrofisinin çift yönlü düzenlenmesini inceleyen sıçanlarda oluşturulan hipertrofik kardiyomiyosit modellerinde, miyokard ve kardiyomiyositlerde miR-223-3p ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. Aksine inflamatuar yanıtı birçok farklı mekanizma aracılığıyla artırarak ilerlemiş KY ve hipertansiyonun neden olduğu konjestif kalp yetmezliği sıçan modelinde ise miR-223-3p seviyeleri artmıştır (Zhang ve ark., 2020). Çalışmamızdan elde edilen veriler, diyabetik kalp dokusunda miR-223 ekspresyonlarının azaldığını ve tedavi gruplarının T2DM grubu ile benzer olduğunu göstermiştir. Kardiyak hipertrofi sonuçlarıyla uyumlu olarak T2DM, EMPA ve DAPA gruplarında Kontrol grubuna kıyasla miR-223 ekspresyonu azalmışken kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranı artmıştır, ek olarak histolojik bulgulardan elde edilen hipertrofik kalp kası görüntüleri de sonuçlarımızı destekler niteliktedir (Şekil 19).

miR-133a, insan kalbinde tespit edilen ve ekspresyonu oldukça fazla olan miRNA'lardan bir tanesidir. miR-133a eksikliği olan farelerde genişlemiş ventriküler septum ve ventriküler duvarların incelmesi gibi yapısal anormallikler vardır. Bunun yanı sıra miyokardiyal dokudaki miR-133a ekspresyonu, çeşitli kardiyak patoloji modellerinde önemli ölçüde azalırken, miR-133a'nın ekspresyonunun artması, miyokardiyal hipertrofi ve miyokardiyal fibrozis gibi patolojik süreçleri önemli ölçüde iyileştirmiştir (Yu ve ark., 2023). Ancak diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda T2DM grubunda kardiyomiyosit hipertrofisi ile ilişkili miR-133a ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur.

Ayrıca T2DM sıçanlarında miR-34a ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. miR-34a geni Bcl2, siklin D1 ve sirtuin 1 (SIRT1)'i genlerini hedef alır ve yapılan çalışmalar miR-34a'nın ekspresyonunun azalmasının kalp fonksiyon bozukluklarını iyileştirdiğini göstermiştir (Fomison-Nurse ve ark., 2018). Ancak bizim çalışmamızda miR-34a ekspresyonunun Kontrol ve EMPA gruplarında T2DM ve DAPA gruplarına kıyasla istatistiksel anlamda arttığı bulunmuştur.

miR-22'nin ekspresyonundaki azalmanın diyabetik kalpte oksidatif stresi arttırdığı ileri sürülmüştür. miR-22'nin hedef geni SIRT1'dir (Jakubik ve ark., 2021). SIRT1 birçok mekanizma ile oksidasyonun düzenlenmesini sağlar. SOD1 ekpresyonunu artırarak ROS üretimini azaltır ve biriken radikalleri uzaklaştırır (Li, 2014). Ek olarak miR-22'nin miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarının patolojik ilerlemesinde rol oynadığı ve kalbin aşırı

basınca bağlı kardiyak hipertrofisine uyum sağlaması için gerekli olduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2021). Çalışmamızda Kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda miR-22 ekspresyonları azalmıştır. Serum ve kalp dokusundaki SOD düzeyleri ile miR-22 ekspresyonları arasındaki ilişkiye bakılırsa serum SOD düzeyleri T2DM'li sıçanlarda Kontrol, EMPA ve DAPA gruplarına kıyasla anlamlı bir oranda azalmıştır. Kalp dokusunda da T2DM grubunun SOD seviyeleri Kontrol ve EMPA gruplarına kıyasla daha azdır ve miR-22 ekspresyonundaki azalmanın da bu konu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

miR-21'in glukozun alımı, glikolizis ve kardiyak PPARα gibi yağ asidi oksidasyonu genlerinin düzenlenmesini sağlayarak kalpte glukoz ve lipit metabolizmasında rol aldığı bildirilmiştir (Dai ve ark., 2017). Son çalışmalarda kardiyak fibrozis, hipertrofi, erken başlangıçlı diyastolik işlev bozukluğu ve geç başlangıçlı sistolik işlev bozukluklarını içeren ve tüm bu olumsuz yapısal yeniden şekillenmenin bir arada bulunmasıyla karakterize edilen diyabetik kardiyomiyopatinin ilerlemesinde miR-21'in rolü gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada YG tedavisi miR-21'in ekspresyonunu artırmış ve kardiyomyosit apoptozuna karşı koruyucu bir etki sergilemiştir. Ayrıca miR-21, kardiyomiyopati indüklü diyastolik fonksiyon bozukluğuna karşı db/db farelerinde koruyucu etki göstermiştir. Bunların aksine ilginç bir şekilde, miR-21'in diyabetik kardiyomyopati gelişimi üzerinde olumsuz etkisi de bulunmuştur. miR-21'in ifadesindeki artış kardiyak fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü indükleyerek, kalbe daha fazla zarar verir ve miyokardiyal fibrozisle sonuçlanır (Scisciola ve ark., 2022). Dolayısıyla miR-21 kardiyak disfonksiyonla ilişkili birçok yola sahiptir, ancak rolü tartışmalıdır (Jin, 2021). Çalışmamızda T2DM, EMPA ve DAPA grubundaki sıçan kalplerinde Kontrol grubuna kıyasla miR-21 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir.

miR-146a, oksidatif stres, apoptoz, inflamasyon ve hipertrofi için önerilen kardiyoprotektif role sahip bir regülatördür. Son zamanlarda IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi inflamatuar genlerin düzenlenmesindeki rolü nedeniyle önem kazanmış, yeni bir tedavi yaklaşımı haline gelmiştir. Çünkü miR-146a ifadesinin azaldığı durumlarda IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi inflamatuvarların seviyeleri artmaktadır (Feng ve ark., 2011; Jakubik ve ark., 2021). Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak T2DM grubu sıçanların kalbinde diğer gruplara kıyasla miR-146a ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, miR-146a ekspresyonlarının yüksek olduğu EMPA ve DAPA gruplarında kTnI ve IL-1β sonuçları da tedavilerin antiinflamatuar etkisinin varlığını göstermiştir.

miRNA'ların sonuçlarının tartışmasının sonuna geldiğimizde literatürle çelişen sonuçlarla ilgili olarak karşımıza bazı ihtimaller çıkmaktadır. Tek bir miRNA geninin birden fazla mRNA genini hedef alabilmesi ve tek bir genin de birden fazla miRNA hedefinin olması miRNA regülasyonlarında bozukluklara yol açabilmektedir. Örneğin aynı genden sorumlu olan iki miRNA'dan bir tanesinin ekspresyonunun artması gerekirken diğerinin artışı onun ekspresyonunu azaltabilir. Bir diğer durum ise çalışmalarda kullanılan insan, sıçan, fare gibi türler arası farklılıklara bağlı olarak miRNA ekspresyonları ve ilişkili sinyal yolaklarında meydana gelebilecek olan değişikliklerin varlığıdır (Bernardo ve ark., 2022; Ha ve ark., 2008). Diğer bir ihtimali değerlendirecek olursak miRNA'ların güncel konu olmaları, aynı hayvan modeli ve amaçla yapılan çalışmaların az oluşu da önem arz etmektedir.

Hiperglisemi kolajen birikimini ve fibroblast proliferasyonunu teşvik eder, böylece kolajenin degredasyonunu azaltarak miyokard fibrozuna neden olur. Dolayısıyla yukarıda da bahsi geçen İGÜ ve İGÜR proteininin ekspresyonlarının artması ve İGÜ-İGÜR arasındaki etkileşim miyokardiyal fibrozis oluşumunu artırır (Hongwei ve ark., 2019). Kardiyak hasarı değerlendirmek amacıyla H&E boyaması ile görüntüleme yapılmış ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrozis ve kas hücrelerinin düzensizliği skorlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında; Kontrole kıyasla T2DM'li sıçanların kalbinde hasarın meydana geldiği ve kalp hasarı modelinin başarıyla oluştuğu ve H&E boyaması ile T2DM modeli oluşturulan sıçan kalp kesitlerinde artan interstisyel fibrozisin varlığı gösterilmiştir. T2DM sıçanlardaki bu histolojik değişiklikler daha önceki çalışmalarla uyumludur (Kumar ve ark., 2022). Kalp dokusundaki fibrozis, birçok miyokard hastalığının ortak bir patofizyolojik değişikliğidir ve sistolik ve diyastolik fonksiyon bozukluğu ve aritmojenez ile de ilişkilidir. Kardiyak kesitlerde H&E boyama sonuçları ile kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranından elde edilen sonuçlar da birbiriyle uyumludur. STZ uygulanan sıçanlarda Kontrol grubuna kıyasla kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranı artmıştır ve histopatolojik analizlerin değerlendirilmesi sonucunda da T2DM sıçan kardiyomiyositlerinde deforme olmuş çekirdekler gözlemlenmiştir ve bu durum patolojiyle birlikte meydana gelen bir yeniden yapılanmanın varlığını göstermektedir (Fang ve ark., 2018; Yanucil ve ark., 2022). Histopatolojik değerlendirmeye göre kardiyomiyosit ve miyofibrillerde görülen hasar T2DM'ye bağlı kardiyomiyopatinin geliştiğini ifade etmektedir. Bununla birlikte, dört haftalık EMPA ve DAPA tedavisi alan gruplarda tedaviler ile inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrozis ve kas hücrelerinin düzensizliği anlamlı şekilde azalmıştır. Bu durum İGÜ-İGÜR etkileşiminin tedaviler tarafından inhibe edilerek

miyokardiyal fibrozisin azaltılması olarak yorumlanabilir. Tedavilerdeki koruyucu etkinin olmadığı durumda kalp kaslarının elastikiyetinin azalması kalp fonksiyonunu bozarak KY'ye neden olmaktadır (Kumar ve ark., 2022). EMPA ve DAPA tedavisinde kalp ağırlığının vücut ağırlığına oranına bakılacak olursa bu oran Kontrole kıyasla artmıştır. Ancak yine de tedaviler ve Kontrol grubu arasında anlamlı istatistiksel fark olmaması ve morfolojik olarak tedavi grupları ile Kontrol grubu arasında yer alan benzerlik EMPA ve DAPA tedavilerinin kalpteki koruyucu etkinliklerini bir kez daha ispatlamıştır. Ayrıca inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrozis ve kas hücrelerinin düzensizliği skor sonuçlarına göre de Kontrol grubu ile tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar yoktur. EMPA ve DAPA kalbin morfolojisinde anlamlı iyileşmeler sağlasa da histopatolojik olarak birbirlerine üstünlük göstermemişlerdir. Niknezhad ve arkadaşları tarafından SGLT2 inhibitörlerinin kalpte koruyucu etki gösterdiği bildirmiştir (Farrokh-Eslamlou ve ark., 2024).

Torasik aorta kesitlerinde; histopatolojik analizlere göre H&E boyama sonuçları ile organ banyosu sonuçlarının birbirleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Bu çalışmadaki histopatolojik bulgular, T2DM'nin damarlarda inflamasyona ve oksidatif strese bağlı hasara neden olduğunu ve DAPA tedavisinin bu hasarı düzeltebildiğini göstermiştir. Ayrıca paralel olarak DAPA tedavisi izole organ banyosu sonuçlarına göre aorta kasılma yanıtlarında Kontrole benzer bir fonksiyon göstermiştir ve T2DM grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Aorta görüntülerinde DAPA grubundan farklı olarak EMPA grubunun histopatolojik analizlerinde inflamatuar hücre infiltrasyonu gösterilmiştir ve benzer şekilde EMPA'nın organ banyosunda DAPA kadar koruyucu etki göstermediği de gözlemlenmiştir.

SGLT2 inhibitörlerinin, kardiyak apoptozun, inflamasyonun ve oksidatif stresin önlenmesi aracılığıyla kardiyoprotektif etkiler gösterdiği ileri sürülmüştür (Shao ve ark., 2019). ELİSA sonuçlarımız, SGLT2 inhibitörlerinin IL-1β ve SOD düzeyleri üzerindeki etkisinin, histolojik bulgularla tutarlı olarak antiinflamatuar ve antioksidan etkilere sahip olduğunu göstermiştir. T2DM grubunda kardiyak hasara neden olan oksidatif stres, kTnI ve IL-1β düzeylerinde artışa neden olurken, EMPA ve DAPA tedavisi oksidatif stresi iyileştirmiş ve sonuçlar Kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. Diyabetik kalpte oksidatif stres ve YG seviyeleri nedeniyle miRNA düzenlenmesinde meydana gelen değişiklikler, yüksek kan glukozu normoglisemik seviyelere dönse bile kalıcı olabilir ve tedavi sonrasında miRNA eski seviyelerine ulaşamayabilir (Jakubik ve ark., 2021). Ancak bu çalışma, SGLT2 inhibitörlerinin bazı

miRNA'lar üzerindeki etkisinin kan glukozu kontrol altına alındığında kalıcı olmadığını ve dolayısıyla bu ilaçların bazı miRNA'ların düzenlenmesine de katkı sağladığını göstermiştir.

Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde;

-T2DM grubunda kan glukoz seviyelerinin arttığı ve vücut ağırlıklarının azaldığı bulunurken, EMPA ve DAPA tedavilerinin haftalık kan glukozu ölçümlerinde kan glukoz seviyelerini ve vücut ağırlığı kaybını azalttığı,

- OGTT ve İTT analizlerinde T2DM grubunda kan glukozunun kontrol altına alınamadığı ve İR'nin varlığı gösterilirken, EMPA ve DAPA tedavisi uygulanan gruplarda kan glukoz seviyelerinin ve İR'nin azaldığı,

-Sıçanların torasik aortalarının izole organ banyosunda kasılma yanıtları değerlendirildiğinde T2DM gruplarında FE'ye verilen kasılma yanıtlarının Kontrol grubuna kıyasla bozulduğu ancak DAPA grubunda ise bu yanıtlardaki bozukluğun düzeltildiği,

-ELİSA analizlerine göre serumda tedavi gruplarında IL-1β seviyeleri azalırken, SOD ve kTnI seviyelerinin arttığı, kalp dokusunda ise tedavi gruplarında kTnI seviyelerinin T2DM grubuna kıyasla azaldığı,

-Kalp dokusunda yapılan miRNA gen ekspresyon analizleri sonucunda miR-221, miR-373, miR-223, miR-22, miR-21 seviyelerinin Kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı ve bu sonuçlardan farklı olarak miR-9 ve miR-34a seviyelerinin EMPA grubunda T2DM ve DAPA grubuna kıyasla, miR-133a seviyesinin T2DM grubunda diğer tüm gruplara kıyasla, miR-146a seviyelerinin EMPA ve DAPA gruplarında T2DM grubuna kıyasla, miR-144 seviyelerinin DAPA grubunda T2DM ve EMPA grubuna kıyasla arttığı,

-Histopatolojik sonuçlar değerlendirildiğinde T2DM gruplarında hipertrofik hücreler ve düzensiz dağılımlar bulunurken tedavi gruplarında ise hücre dağılımlarının Kontrol grubuna paralel sonuçlar gösterdiği bulunmuştur.

Çalışmamızda SGLT2 inhibitörlerinin, T2DM kalp dokusunda azalan kan glukozu düzeylerinden bağımsız olarak hemodinamik, antioksidan ve inflamatuar parametreleri iyileştirdiğini görülmüştür. T2DM ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklarda kardiyoprotektif SGLT2 inhibitörlerinin etki mekanizmaları arasındaki farklılıkları anlamak için yapılan

araştırmalarda literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. EMPA ve DAPA tedavisiyle ekspresyonu değişen miRNA'ların ilgili sinyal yolak mekanizmaları yeni planlanacak araştırmalara katkı sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR

Ablat, A., Halabi, M. F., Mohamad, J., Hasnan, M. H. H., Hazni, H., Teh, S.-h., Shilpi, J. A., Mohamed, Z. ve Awang, K. (2017). Antidiabetic effects of Brucea javanica seeds in type 2 diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-14. https://doi.org/10.1186/s12906-017-1610-x

Afsharmanesh, M. R., Mohammadi, Z., Mansourian, A. R. ve Jafari, S. M. (2023). A Review of micro RNAs changes in T2DM in animals and humans. *Journal of Diabetes*, 15,(8), 649-664. https://doi.org/10.1111/1753-0407.13431

Aikaeli, F., Njim, T., Gissing, S., Moyo, F., Alam, U., Mfinanga, S. G., Okebe, J., Ramaiya, K., Webb, E. L., Jaffar, S. ve Garrib, A. (2022). Prevalence of microvascular and macrovascular complications of diabetes in newly diagnosed type 2 diabetes in low-and-middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Glob Public Health*, 2,(6), e0000599. https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0000599

Albayrak, İ.G. (2022). miRNA'lar: Biyogenezi, Analiz Yöntemleri ve Biyobelirteç Potansiyeli. V*an Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15(1), 95-102. https://doi.org/10.52976/vansaglik.952243

Ali, A., Iqbal, F., Taj, A., Iqbal, Z., Amin, M. J. ve Iqbal, Q. Z. (2013). Prevalence of microvascular complications in newly diagnosed patients with type 2 diabetes. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 29,(4), 899-902. https://doi.org/10.12669/pjms.294.3704

Altamimi, J. Z., BinMowyna, M. N., AlFaris, N. A., Alagal, R. I., El-kott, A. F. ve Al-Farga, A. M. (2021). Fisetin protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats by suppressing fatty acid oxidation and inhibiting protein kinase R. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29,(1), 27-42. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.12.003

Arow, M., Waldman, M., Yadin, D., Nudelman, V., Shainberg, A., Abraham, N. G., Freimark, D., Kornowski, R., Aravot, D., Hochhauser, E. ve Arad, M. (2020). Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor Dapagliflozin attenuates diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*, 19,(1), 7. https://doi.org/10.1186/s12933-019-0980-4

Attachaipanich, T., Chattipakorn, S. C. ve Chattipakorn, N. (2022). Potential roles of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors in attenuating cardiac arrhythmias in diabetes and heart failure. *Journal of Cellular Physiology*, 237,(5), 2404-2419. https://doi.org/10.1002/jcp.30727

Banday, M. Z., Sameer, A. S. ve Nissar, S. (2020). Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna journal of medicine*, 10,(04), 174-188. https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20

Bellido, V., Martínez, J., Calvo, F., Villarroel, A., Lecumberri, E., Moreno, J., Morillas, C., Rodrigo, S., Izarra, A. ve Lecube, A. (2022). Beyond the Glycaemic Control of Dapagliflozin: Microangiopathy and Non-classical Complications. *Diabetes Therapy*, 13,(5), 873-888. https://doi.org/10.1007/s13300-022-01237-9

Bernardo, B. C., Yildiz, G. S., Kiriazis, H., Harmawan, C. A., Tai, C. M. K., Ritchie, R. H. ve McMullen, J. R. (2022). In Vivo Inhibition of miR-34a Modestly Limits Cardiac Enlargement and Fibrosis in a Mouse Model with Established Type 1 Diabetes-Induced Cardiomyopathy, but Does Not Improve Diastolic Function. *Cells*, 11,(19). https://doi.org/10.3390/cells11193117

Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W. ve Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity. *Molecular cell*, 64,(2), 320-333. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004

Bugga, P., Mohammed, S. A., Alam, M. J., Katare, P., Meghwani, H., Maulik, S. K., Arava, S. ve Banerjee, S. K. (2022). Empagliflozin prohibits high-fructose diet-induced cardiac dysfunction in rats via attenuation of mitochondria-driven oxidative stress. *Life Sciences*, 307, 120862. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120862

Bui, H. D. T., Jing, X., Lu, R., Chen, J., Ngo, V., Cui, Z., Liu, Y., Li, C. ve Ma, J. (2019). Prevalence of and factors related to microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus in Tianjin, China: a cross-sectional study. *Annals of Translational Medicine*, 7,(14), 325. https://doi.org/10.21037/atm.2019.06.08

Chen, D. ve Zhang, M. (2021). GAS5 regulates diabetic cardiomyopathy via miR-221-3p/p27 axis-associated autophagy. *Molecular Medicine Reports*, 23,(2), 1-1. http://doi.org/10.3892/mmr.2020.11774

Chen, H., Tran, D., Yang, H. C., Nylander, S., Birnbaum, Y. ve Ye, Y. (2020). Dapagliflozin and Ticagrelor Have Additive Effects on the Attenuation of the Activation of the NLRP3 Inflammasome and the Progression of Diabetic Cardiomyopathy: an AMPK-mTOR Interplay. *Cardiovascular Drugs Therapy*, 34,(4), 443-461. https://doi.org/10.1007/s10557-020-06978-y

Chen, Q., Zhou, Y., Richards, A. M. ve Wang, P. (2016). Up-regulation of miRNA-221 inhibits hypoxia/reoxygenation-induced autophagy through the DDIT4/mTORC1 and Tp53inp1/p62 pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474,(1), 168-174. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.090

Chong, K., Chang, J. K. J. ve Chuang, L. M. (2024). Recent advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus using new drug therapies. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. https://doi.org/10.1002/kjm2.12800

Cole, J. B. ve Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology*, 16,(7), 377-390. https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5

Copier, C. U., León, L., Fernández, M., Contador, D. ve Calligaris, S. D. (2017). Circulating miR-19b and miR-181b are potential biomarkers for diabetic cardiomyopathy. *Scientific Reports*, 7,(1), 13514. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13875-2

Costantino, S., Paneni, F., Lüscher, T. F. ve Cosentino, F. (2016). MicroRNA profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart. *European Heart Journal*, 37,(6), 572-576. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv599

Cowie, M. R. ve Fisher, M. (2020). SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control. *Nature Reviews Cardiology*, 17,(12), 761-772. https://doi.org/10.1038/s41569-020-0406-8

Dai, Q., Li, N. ve Zhou, X. (2017). Increased miR-21a provides metabolic advantages through suppression of FBP1 expression in non-small cell lung cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, 7,(11), 2121.

Dharap, A., Pokrzywa, C., Murali, S., Pandi, G. ve Vemuganti, R. (2013). MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *Plos One*, 8,(11), e79467. https://doi:10.1371/journal.pone.0079467

Dia, B., Alkhansa, S., Njeim, R., Al Moussawi, S., Farhat, T., Haddad, A., Riachi, M. E., Nawfal, R., Azar, W. S. ve Eid, A. A. (2023). SGLT2 Inhibitor-Dapagliflozin Attenuates Diabetes-Induced Renal Injury by Regulating Inflammation through a CYP4A/20-HETE Signaling Mechanism. *Pharmaceutics*, 15,(3), 965. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030965

Escobar, C., Pascual-Figal, D., Manzano, L., Nuñez, J. ve Camafort, M. (2023). Current Role of SLGT2 Inhibitors in the Management of the Whole Spectrum of Heart Failure: Focus on Dapagliflozin. *Journal of Clinical Medicine*, 12,(21). https://doi.org/10.3390/jcm12216798

Fang, J.-Y., Lin, C.-H., Huang, T.-H. ve Chuang, S.-Y. (2019). In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity. *Nutrients*, 11,(3), 530. https://doi.org/10.3390/nu11030530

Fang, W.-j., Wang, C.-j., He, Y., Zhou, Y.-l., Peng, X.-d. ve Liu, S.-k. (2018). Resveratrol alleviates diabetic cardiomyopathy in rats by improving mitochondrial function through PGC-1α deacetylation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39,(1), 59-73. https://doi.org/10.1038/aps.2017.50

Farrag, E. A. E., Hammad, M. O., Safwat, S. M., Hamed, S. ve Hellal, D. (2023). Artemisinin attenuates type 2 diabetic cardiomyopathy in rats through modulation of AGE-RAGE/HMGB-1 signaling pathway. *Scientific Reports*, 13,(1), 11043. https://doi.org/10.1038/s41598-023-37678-w

Farrokh-Eslamlou, N., Momtaz, S., Niknejad, A., Hosseini, Y., Mahdaviani, P., Ghasemnejad-Berenji, M. ve Abdolghaffari, A. H. (2024). Empagliflozin protective effects against cisplatin-induced acute nephrotoxicity by interfering with oxidative stress and inflammation in Wistar rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. https://doi.org/10.1007/s00210-024-03088-6

Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E., Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W. ve Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 5,(1), 41. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1

Feng, B., Chen, S., George, B., Feng, Q. ve Chakrabarti, S. (2010). miR133a regulates cardiomyocyte hypertrophy in diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 26,(1), 40-49. https://doi.org/10.1002/dmrr.1054

Feng, B., Chen, S., McArthur, K., Wu, Y., Sen, S., Ding, Q., Feldman, R. D. ve Chakrabarti, S. (2011). miR-146a–mediated extracellular matrix protein production in chronic diabetes complications. *Diabetes*, 60,(11), 2975-2984. https://doi.org/10.2337/db11-0478

Fomison-Nurse, I., Saw, E. E. L., Gandhi, S., Munasinghe, P. E., Van Hout, I., Williams, M. J. A., Galvin, I., Bunton, R., Davis, P., Cameron, V. ve Katare, R. (2018). Diabetes induces the activation of pro-ageing miR-34a in the heart, but has differential effects on cardiomyocytes and cardiac progenitor cells. *Cell Death & Differentiation*, 25,(7), 1336-1349. https://doi.org/10.1038/s41418-017-0047-6

Frias, J. P., Deenadayalan, S., Erichsen, L., Knop, F. K., Lingvay, I., Macura, S., Mathieu, C., Pedersen, S. D. ve Davies, M. (2023). Efficacy and safety of co-administered once-weekly cagrilintide 2· 4 mg with once-weekly semaglutide 2· 4 mg in type 2 diabetes: a multicentre, randomised, double-blind, active-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*, 402,(10403), 720-730. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01163-7

Furman, B. L. (2021). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols*, 1,(4), e78. https://doi.org/10.1002/cpz1.78

Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H. ve Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21,(17). https://doi.org/10.3390/ijms21176275

Garcia-Ropero, A., Badimon, J. J. ve Santos-Gallego, C. G. (2018). The pharmacokinetics and pharmacodynamics of SGLT2 inhibitors for type 2 diabetes mellitus: the latest developments. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 14,(12), 1287-1302. https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1551877

Ghasemi, A., & Jeddi, S. (2023). Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: A practical guide. *EXCLI journal*, 22, 274.

Gumede, N., Ngubane, P. ve Khathi, A. (2022). Assessing the risk factors for myocardial infarction in diet-induced prediabetes: myocardial tissue changes. *BMC Cardiovascular Disorders*, 22,(1), 350. https://doi.org/10.1186/s12872-022-02758-8

Guo, T., Pan, Y., Yang, L., Chen, G., Deng, J. ve Zhu, L. (2023). Flavonoid compound from Agrimonia pilosa Ledeb improves adipose insulin resistance by alleviating oxidative stress and inflammation. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23,(1), 322. https://doi.org/10.1186/s12906-023-04114-5

Ha, M. ve Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15,(8), 509-524. https://doi.org/10.1038/nrm3838

Ha, M., Pang, M., Agarwal, V. ve Chen, Z. J. (2008). Interspecies regulation of microRNAs and their targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779,(11), 735-742. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2008.03.004

Hashish, H. A. ve Abd El-Kader, M. (2019). Potential role of empagliflozin in prevention of nephropathy in streptozotocin-Nicotinamideinduced type 2 diabetes: An ultrastructural study. *Anatomy*, 13,(3), 137-148.

Herder, C., Dalmas, E., Böni-Schnetzler, M. ve Donath, M. Y. (2015). The IL-1 pathway in type 2 diabetes and cardiovascular complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26,(10), 551-563. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.08.001

Ho, P. T. B., Clark, I. M. ve Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23,(13), 7167. https://doi.org/10.3390/ijms23137167

Hongwei, Y., Ruiping, C., Yingyan, F., Guanjun, Z., Jie, H., Xingyu, L., Jie, T., Zhenghong, L., Qin, G., Junfeng, H. ve Heng, Z. (2019). Effect of Irbesartan on AGEs-RAGE and MMPs systems in rat type 2 diabetes myocardial-fibrosis model. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 244,(7), 612-620. https://doi.org/10.1177/1535370219840981

Huang, J.-P., Chang, C.-C., Kuo, C.-Y., Huang, K.-J., Sokal, E. M., Chen, K.-H. ve Hung, L.-M. (2022). Exosomal microRNAs miR-30d-5p and miR-126a-5p Are Associated with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in STZ-Induced Type 1 Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 23,(14), 7514. https://doi.org/10.3390/ijms23147514

Huntzinger, E. ve Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12,(2), 99-110. https://doi.org/10.1038/nrg2936

Iantomasi, T., Romagnoli, C., Palmini, G., Donati, S., Falsetti, I., Miglietta, F., ... & Brandi, M.L. (2023). Oxidative stress and inflammation in osteoporosis: molecular mechanisms involved and the relationship with microRNAs. *International journal of molecular sciences*, 24(4), 3772. https://doi.org/10.3390/ijms24043772

Ipsaro, J. J. ve Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nature structural & molecular biology*, 22,(1), 20-28. https://doi.org/10.1038/nsmb.2931

Jakubik, D., Fitas, A., Eyileten, C., Jarosz-Popek, J., Nowak, A., Czajka, P., Wicik, Z., Sourij, H., Siller-Matula, J. M. ve De Rosa, S. (2021). MicroRNAs and long non-coding RNAs in the pathophysiological processes of diabetic cardiomyopathy: emerging biomarkers and potential therapeutics. *Cardiovascular diabetology*, 20,(1), 1-29. https://doi.org/10.1186/s12933-021-01245-2

Jastreboff, A. M. ve Kushner, R. F. (2023). New frontiers in obesity treatment: GLP-1 and nascent nutrient-stimulated hormone-based therapeutics. *Annual review of medicine*, 74, 125-139. https://doi.org/10.1146/annurev-med-043021-014919

Jeyabal, P., Thandavarayan, R. A., Joladarashi, D., Suresh Babu, S., Krishnamurthy, S., Bhimaraj, A., Youker, K. A., Kishore, R. ve Krishnamurthy, P. (2016). MicroRNA-9 inhibits hyperglycemia-induced pyroptosis in human ventricular cardiomyocytes by targeting ELAVL1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471,(4), 423-429. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.065

Jin, Z.-Q. (2021). MicroRNA targets and biomarker validation for diabetes-associated cardiac fibrosis. *Pharmacological Research*, 174, 105941. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105941

Katare, R., Caporali, A., Zentilin, L., Avolio, E., Sala-Newby, G., Oikawa, A., Cesselli, D., Beltrami, A. P., Giacca, M. ve Emanueli, C. (2011). Intravenous gene therapy with PIM-1 via a cardiotropic viral vector halts the progression of diabetic cardiomyopathy through promotion of prosurvival signaling. *Circulation Research*, 108,(10), 1238-1251. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.239111

Knapp, M., Tu, X. ve Wu, R. (2019). Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40,(1), 1-8. https://doi.org/10.1038/s41401-018-0042-6

Kosmas, C.E., Bousvarou, M.D., Kostara, C.E., Papakonstantinou, E.J., Salamou, E., & Guzman, E. (2023). Insulin resistance and cardiovascular disease. *Journal of International Medical Research*, 51(3). https://doi.org/10.1177/03000605231164548

Kräker, K., Herse, F., Golic, M., Reichhart, N., Crespo-Garcia, S., Strauß, O., Grune, J., Kintscher, U., Ebrahim, M., Bader, M., Alenina, N., Heuser, A., Luft, F. C., Müller, D. N., Dechend, R. ve Haase, N. (2020). Effects of empagliflozin and target-organ damage in a novel rodent model of heart failure induced by combined hypertension and diabetes. *Scientific Reports*, 10,(1), 14061. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70708-5

Kukoyi, A. T., Fan, X., Staitieh, B. S., Hybertson, B. M., Gao, B., McCord, J. M. ve Guidot, D. M. (2019). MiR-144 mediates Nrf2 inhibition and alveolar epithelial dysfunction in

HIV-1 transgenic rats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 317,(2), C390-c397. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00038.2019

Kumar, A., Badoni, S. ve Sati, A. (2019). Evaluation of Dapagliflozin in diabetes induced endothelial dysfunction in rats. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5,(1), 172-179. https://doi.org/10.31024/ajpp.2019.5.1.25

Kumar, C. U., Reddy, S. S., Suryanarayana, P., Patil, M. A., Chary, P. M., Kumar, P. U. ve Reddy, G. B. (2022). Protective effect of cinnamon on diabetic cardiomyopathy in nicotinamide-streptozotocin induced diabetic rat model. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 21,(1), 141-150. https://doi.org/10.1007/s40200-021-00948-3

Kura, B., Szeiffova Bacova, B., Kalocayova, B., Sykora, M. ve Slezak, J. (2020). Oxidative Stress-Responsive MicroRNAs in Heart Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 21,(1). https://doi.org/10.3390/ijms21010358

Latreille, M., Hausser, J., Stützer, I., Zhang, Q., Hastoy, B., Gargani, S., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Zavolan, M. ve Esguerra, J. L. (2014). MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function. *The Journal of clinical investigation*, 124,(6), 2722-2735. https://doi.org/10.1172/JCI73066

León, L. E., Rani, S., Fernandez, M., Larico, M. ve Calligaris, S. D. (2016). Subclinical Detection of Diabetic Cardiomyopathy with MicroRNAs: Challenges and Perspectives. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 6143129. https://doi.org/10.1155/2016/6143129

Li, H. (2014). Sirtuin 1 (SIRT1) and Oxidative Stress. In I. Laher (Ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* (pp. 417-435). https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_17

Li, H., Fan, J., Zhao, Y., Zhang, X., Dai, B., Zhan, J., Yin, Z., Nie, X., Fu, X.-D. ve Chen, C. (2019). Nuclear miR-320 mediates diabetes-induced cardiac dysfunction by activating transcription of fatty acid metabolic genes to cause lipotoxicity in the heart. *Circulation Research*, 125,(12), 1106-1120. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314898

Li, N., Zhou, H. ve Tang, Q. (2018). miR-133: a suppressor of cardiac remodeling? *Frontiers in pharmacology*, 9, 903. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00903

Ma, C. X., Ma, X. N., Guan, C. H., Li, Y. D., Mauricio, D. ve Fu, S. B. (2022). Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: progress toward personalized management. *Cardiovascular Diabetology*, 21,(1), 74. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01516-6

Mahgoub, M. O., Ali, I. I., Adeghate, J. O., Tekes, K., Kalász, H., & Adeghate, E. A. (2023). An update on the molecular and cellular basis of pharmacotherapy in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9328. https://doi.org/10.3390/ijms24119328

Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., Turchinovich, A. A. ve Tonevitsky, A. G. (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 51,(3-4), 33-49. https://doi.org/10.1016/j.proghi.2016.06.001

Mansour, A., Mousa, M., Abdelmannan, D., Tay, G., Hassoun, A. ve Alsafar, H. (2023). Microvascular and macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus: Exome wide association analyses. *Frontiers Endocrinology (Lausanne)*, 14, 1143067. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1143067

Mascolo, A., di Mauro, G., Cappetta, D., De Angelis, A., Torella, D., Urbanek, K., Berrino, L., Nicoletti, G. F., Capuano, A. ve Rossi, F. (2022). Current and future therapeutic perspective in chronic heart failure. *Pharmacological Research*, 175, 106035. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106035

Massaro, J. D., Polli, C. D., e Silva, M. C., Alves, C. C., Passos, G. A., Sakamoto-Hojo, E. T., de Holanda Miranda, W. R., Cezar, N. J. B., Rassi, D. M. ve Crispim, F. (2019). Post-transcriptional markers associated with clinical complications in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Molecular and cellular endocrinology*, 490, 1-14. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.03.008

McClelland, A. D. ve Kantharidis, P. (2013). microRNA in the development of diabetic complications. *Clinical Science*, 126,(2), 95-110. https://doi.org/10.1042/cs20130079

Memon, R. A., Akbariromani, H., Vohra, R. R., Kundi, H., Saleem, R. F., Ghaffari, M. A., Haas, D. ve Khan, A. (2022). Comparison of Cardiovascular Outcomes Between Dapagliflozin and Empagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Cureus*, 14,(7), e27277. https://doi.org/10.7759/cureus.27277

Mencia, R., Gonzalo, L., Tossolini, I., & Manavella, P. A. (2023). Keeping up with the miRNAs: current paradigms of the biogenesis pathway. *Journal of Experimental Botany*, 74, (7), 2213-2227. https://doi.org/10.1093/jxb/erac322

Min, R., Xu, Y., & Peng, B. (2023). The clinical value of glycosylated hemoglobin level in newly diagnosed ketosis-prone type 2 diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1244008. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1244008

Nakhal, M. M., Aburuz, S., Sadek, B. ve Akour, A. (2022). Repurposing SGLT2 inhibitors for neurological disorders: a focus on the autism spectrum disorder. *Molecules*, 27,(21), 7174. https://doi.org/10.3390/molecules27217174

Natalicchio, A., Montagnani, M., Gallo, M., Marrano, N., Faggiano, A., Zatelli, M. C., Mazzilli, R., Argentiero, A., Danesi, R., D'Oronzo, S., Fogli, S., Giuffrida, D., Gori, S., Ragni, A., Renzelli, V., Russo, A., Franchina, T., Tuveri, E., Sciacca, L., Monami, M., Cirino, G., Di Cianni, G., Colao, A., Avogaro, A., Cinieri, S., Silvestris, N. ve Giorgino, F. (2023). MiRNA dysregulation underlying common pathways in type 2 diabetes and cancer development: an Italian Association of Medical Oncology (AIOM)/Italian Association of Medical Diabetologists (AMD)/Italian Society of Diabetology (SID)/Italian Society of Endocrinology (SIE)/Italian Society of Pharmacology (SIF) multidisciplinary critical view. *ESMO Open*, 8,(3), 101573. https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.101573

Nikolaou, P. E., Mylonas, N., Makridakis, M., Makrecka-Kuka, M., Iliou, A., Zerikiotis, S., Efentakis, P., Kampoukos, S., Kostomitsopoulos, N., Vilskersts, R., Ikonomidis, I., Lambadiari, V., Zuurbier, C. J., Latosinska, A., Vlahou, A., Dimitriadis, G., Iliodromitis, E. K. ve Andreadou, I. (2022). Cardioprotection by selective SGLT-2 inhibitors in a non-diabetic mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury: a class or a drug effect? *Basic Research in Cardiology*, 117,(1), 27. https://doi.org/10.1007/s00395-022-00934-7

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. ve Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers Endocrinology (Lausanne)*, 9, 402. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402

Ortiz-Martínez, M., González-González, M., Martagón, A. J., Hlavinka, V., Willson, R. C. ve Rito-Palomares, M. (2022). Recent Developments in Biomarkers for Diagnosis and Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports*, 22,(3), 95-115. https://doi.org/10.1007/s11892-022-01453-4

Othman, A. I., El-Sawi, M. R., El-Missiry, M. A. ve Abukhalil, M. H. (2017). Epigallocatechin-3-gallate protects against diabetic cardiomyopathy through modulating the cardiometabolic risk factors, oxidative stress, inflammation, cell death and fibrosis in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 94, 362-373. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.129

Padhi, S., Nayak, A. K. ve Behera, A. (2020). Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110708. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708

Paschou, S. A. ve Alexandrides, T. (2019). A year in type 2 diabetes mellitus: 2018 review based on the Endorama lecture. *Hormones*, 18,(4), 401-408. https://doi.org/10.1007/s42000-019-00139-z

Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, R. S., Malakar, A. K. ve Chakraborty, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 233,(3), 2007-2018. https://doi.org/10.1002/jcp.25854

Pegtel, D. M. ve Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual review of biochemistry*, 88, 487-514. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902

Piegari, E., Cozzolino, A., Ciuffreda, L. P., Cappetta, D., De Angelis, A., Urbanek, K., Rossi, F. ve Berrino, L. (2020). Cardioprotective effects of miR-34a silencing in a rat model of doxorubicin toxicity. *Sciences Reports*, 10,(1), 12250. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69038-3

Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N. ve Rorsman, P. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 432,(7014), 226-230.

Rais, N., Ved, A., Ahmad, R., Parveen, K., Gautam, G. K., Bari, D. G., Shukla, K. S., Gaur, R. ve Singh, A. P. (2022). Model of Streptozotocin-nicotinamide Induced Type 2 Diabetes: a Comparative Review. *Current Diabetes Reviews*, 18,(8), e171121198001. https://doi.org/10.2174/1573399818666211117123358

Raut, S. S., Acharya, S., Deolikar, V. ve Mahajan, S. (2024). Navigating the Frontier: Emerging Techniques for Detecting Microvascular Complications in Type 2 Diabetes Mellitus: A Comprehensive Review. *Cureus*, 16,(1), e53279. https://doi.org/10.7759/cureus.53279

Ridwan, M., Dimiati, H., Syukri, M., & Lesmana, R. (2023). Potential molecular mechanism underlying cardiac fibrosis in diabetes mellitus: A narrative review. *The Egyptian Heart Journal*, 75(1), 46. https://doi.org/10.1186/s43044-023-00376-z

Roggli, E., Gattesco, S., Caille, D., Briet, C., Boitard, C., Meda, P. ve Regazzi, R. (2012). Changes in microRNA expression contribute to pancreatic β-cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes*, 61,(7), 1742-1751. https://doi.org/10.2337/db11-1086

World Health Organization. (2016). Global report on diabetes (ISBN: 9789241565257). Management-Screening, Diagnosis and Treatment (MND). https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257

Rosenstock, J., Frias, J., Jastreboff, A. M., Du, Y., Lou, J., Gurbuz, S., Thomas, M. K., Hartman, M. L., Haupt, A. ve Milicevic, Z. (2023). Retatrutide, a GIP, GLP-1 and glucagon receptor agonist, for people with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo and active-controlled, parallel-group, phase 2 trial conducted in the USA. *The Lancet*, 402,(10401), 529-544. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01053-X

Rottiers, V. ve Näär, A. M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13,(4), 239-250. https://doi.org/10.1038/nrm3313

Sakran, N., Graham, Y., Pintar, T., Yang, W., Kassir, R., Willigendael, E. M., Singhal, R., Kooreman, Z. E., Ramnarain, D., Mahawar, K., Parmar, C., Madhok, B. ve Pouwels, S. (2022). The many faces of diabetes. Is there a need for re-classification? A narrative review. *BMC Endocrine Disorders*, 22,(1), 9. https://doi.org/10.1186/s12902-021-00927-y

Scisciola, L., Benedetti, R., Chianese, U., Fontanella, R. A., Del Gaudio, N., Marfella, R., Altucci, L., Barbieri, M. ve Paolisso, G. (2022). The pivotal role of miRNA-21 in myocardial metabolic flexibility in response to short-and long-term high glucose treatment: Evidence in human cardiomyocyte cell line. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 191, 110066. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.110066

Sefidgari-Abrasi, S., Karimi, P., Roshangar, L., Morshedi, M., Bavafa-Valenlia, K., Saghafi-Asl, M., Mohiti, S. ve Rahimiyan-Heravan, M. (2020). Lactobacillus plantarum And Inulin: Therapeutic Agents to Enhance Cardiac Ob Receptor Expression and Suppress Cardiac Apoptosis in Type 2 Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*, 2020, 4745389. https://doi.org/10.1155/2020/4745389

Shan, Z.-X., Lin, Q.-X., Deng, C.-Y., Zhu, J.-N., Mai, L.-P., Liu, J.-L., Fu, Y.-H., Liu, X.-Y., Li, Y.-X. ve Zhang, Y.-Y. (2010). miR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS letters*, 584,(16), 3592-3600. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.027

Shantikumar, S., Caporali, A. ve Emanueli, C. (2011). Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. *Cardiovascular Research*, 93,(4), 583-593. https://doi.org/10.1093/cvr/cvr300

Shao, Q., Meng, L., Lee, S., Tse, G., Gong, M., Zhang, Z., Zhao, J., Zhao, Y., Li, G. ve Liu, T. (2019). Empagliflozin, a sodium glucose co-transporter-2 inhibitor, alleviates atrial remodeling and improves mitochondrial function in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular diabetology*, 18,(1), 165. https://doi.org/10.1186/s12933-019-0964-4

Shen, E., Diao, X., Wang, X., Chen, R. ve Hu, B. (2011). MicroRNAs involved in the mitogen-activated protein kinase cascades pathway during glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy. *The American journal of pathology*, 179,(2), 639-650. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.034

Shukla, S. K., Liu, W., Sikder, K., Addya, S., Sarkar, A., Wei, Y. ve Rafiq, K. (2017). HMGCS2 is a key ketogenic enzyme potentially involved in type 1 diabetes with high cardiovascular risk. *Scientific Reports*, 7,(1), 4590. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04469-z

Slieker, R. C., Donnelly, L. A., Akalestou, E., Lopez-Noriega, L., Melhem, R., Güneş, A., Abou Azar, F., Efanov, A., Georgiadou, E., Muniangi-Muhitu, H., Sheikh, M., Giordano, G. N., Åkerlund, M., Ahlqvist, E., Ali, A., Banasik, K., Brunak, S., Barovic, M., Bouland,

G. A., Burdet, F., Canouil, M., Dragan, I., Elders, P. J. M., Fernandez, C., Festa, A., Fitipaldi, H., Froguel, P., Gudmundsdottir, V., Gudnason, V., Gerl, M. J., van der Heijden, A. A., Jennings, L. L., Hansen, M. K., Kim, M., Leclerc, I., Klose, C., Kuznetsov, D., Mansour Aly, D., Mehl, F., Marek, D., Melander, O., Niknejad, A., Ottosson, F., Pavo, I., Duffin, K., Syed, S. K., Shaw, J. L., Cabrera, O., Pullen, T. J., Simons, K., Solimena, M., Suvitaival, T., Wretlind, A., Rossing, P., Lyssenko, V., Legido Quigley, C., Groop, L., Thorens, B., Franks, P. W., Lim, G. E., Estall, J., Ibberson, M., Beulens, J. W. J., 't Hart, L. M., Pearson, E. R. ve Rutter, G. A. (2023). Identification of biomarkers for glycaemic deterioration in type 2 diabetes. *Nature Communications*, 14,(1), 2533. https://doi.org/10.1038/s41467-023-38148-7

Sonmez, M. I., Shahzadi, A., Kose, C., Sonmez, H., Ozyazgan, S. ve Akkan, A. G. (2022). Effect of sulfasalazine on endothelium-dependent vascular response by the activation of Nrf2 signalling pathway. *Frontiers Pharmacology*, 13, 979300. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.979300

Sun, Y., Tao, Q., Wu, X., Zhang, L., Liu, Q. ve Wang, L. (2021). The Utility of Exosomes in Diagnosis and Therapy of Diabetes Mellitus and Associated Complications. *Frontiers Endocrinology (Lausanne)*, 12, 756581. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.756581

Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A. ve Shibasaki, M. (2011). Effects of antidiabetic drugs in high-fat diet and streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, 655,(1-3), 108-116. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.015

Tang, Q., Len, Q., Liu, Z. ve Wang, W. (2018). Overexpression of miR-22 attenuates oxidative stress injury in diabetic cardiomyopathy via Sirt 1. *Cardiovascular Therapeutics*, 36,(2). https://doi.org/10.1111/1755-5922.12318

Tanzer, A. ve Stadler, P. F. (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *Journal of molecular biology*, 339,(2), 327-335. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.065

Tao, L., Huang, X., Xu, M., Yang, L. ve Hua, F. (2020). MiR-144 protects the heart from hyperglycemia-induced injury by regulating mitochondrial biogenesis and cardiomyocyte apoptosis. *The FASEB Journal*, 34,(2), 2173-2197. https://doi.org/10.1096/fj.201901838R

Thampan, R. V., Krishnaraj, K., Ali, H. S., Kannan, S., Mrudhula, C., Aravindakumar, C. ve Haridas, M. (2020). Insulin Signalling: Essential Role of a 222 Da Molecular Mediator, Co-Insulin (Co-Ins). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90, 843-853. https://doi.org/10.1007/s40011-019-01157-y

Teo, Z.L., Tham, Y.C., Yu, M., Chee, M.L., Rim, T.H., Cheung, N., ... & Cheng, C.Y. (2021). Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 128(11), 1580-1591. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2021.04.027

Tüfekci, K. U., Öner, M. G., Meuwissen, R. L. J. ve Genç, Ş. (2014). The role of microRNAs in human diseases. *miRNomics: MicroRNA biology and computational analysis*, 33-50. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-748-8_3

Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3,(3), 311-330. https://doi.org/10.1002/wrna.121

Vickers, Kasey C., Rye, K.-A. ve Tabet, F. (2013). microRNAs in the onset and development of cardiovascular disease. *Clinical Science*, 126,(3), 183-194. https://doi.org/10.1042/cs20130203

Wang, C., Liu, G., Yang, H., Guo, S., Wang, H., Dong, Z., Li, X., Bai, Y. ve Cheng, Y. (2021). MALAT1-mediated recruitment of the histone methyltransferase EZH2 to the microRNA-22 promoter leads to cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Science of The Total Environment*, 766, 142191. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142191

Williams, D. M., Nawaz, A., & Evans, M. (2021). Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: are they all the same? A narrative review of cardiovascular outcome trials. *Diabetes Therapy*, 12(1), 55-70. https://doi.org/10.1007/s13300-020-00951-6

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3), 228-234. https://doi.org/10.1038/ncb0309-228

Wieczór, R., Wieczór, A. M., Kulwas, A. ve Rość, D. (2019). Type 2 diabetes and cardiovascular factors contrasted with fibrinolysis disorders in the blood of patients with peripheral arterial disease. *Medicina*, 55,(7), 395. https://doi.org/10.3390/medicina55070395

Wong, N. D. ve Sattar, N. (2023). Cardiovascular risk in diabetes mellitus: epidemiology, assessment and prevention. *Nature Reviews Cardiology*, 20,(10), 685-695. https://doi.org/10.1038/s41569-023-00877-z

Xing, Y. J., Liu, B. H., Wan, S. J., Cheng, Y., Zhou, S. M., Sun, Y., Yao, X. M., Hua, Q., Meng, X. J., Cheng, J. H., Zhong, M., Zhang, Y., Lv, K. ve Kong, X. (2021). A SGLT2 Inhibitor Dapagliflozin Alleviates Diabetic Cardiomyopathy by Suppressing High Glucose-Induced Oxidative Stress in vivo and in vitro. *Frontiers Pharmacology*, 12, 708177. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.708177

Xu, B., Li, S., Kang, B. ve Zhou, J. (2022). The current role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus management. *Cardiovascular Diabetology*, 21,(1), 83. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01512-w

Xu, W., San Lucas, A., Wang, Z. ve Liu, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC bioinformatics*, 15, 1-11. https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S7-S4

Yang, S.-C., Hsu, C.-Y., Chou, W.-L., Fang, J.-Y. ve Chuang, S.-Y. (2020). Bioactive Agent Discovery from the Natural Compounds for the Treatment of Type 2 Diabetes Rat Model. *Molecules*, 25,(23), 5713. https://doi.org/10.3390/molecules25235713

Yanucil, C., Kentrup, D., Li, X., Grabner, A., Schramm, K., Martinez, E. C., Li, J., Campos, I., Czaya, B., Heitman, K., Westbrook, D., Wende, A. R., Sloan, A., Roche, J. M., Fornoni, A., Kapiloff, M. S. ve Faul, C. (2022). FGF21-FGFR4 signaling in cardiac myocytes promotes concentric cardiac hypertrophy in mouse models of diabetes. *Scientific Reports*, 12,(1), 7326. https://doi.org/10.1038/s41598-022-11033-x

Yu, M. G., Gordin, D., Fu, J., Park, K., Li, Q. ve King, G. L. (2024). Protective Factors and the Pathogenesis of Complications in Diabetes. *Endocrine Reviews*, 45,(2), 227-252. https://doi.org/10.1210/endrev/bnad030

Yu, Y.-n., Ren, Y.-y., Shao, Z.-l., Chen, B.-l., Cui, B.-y., Chao, C.-y., Guo, L.-j., Guo, S., Zhang, M.-x., Wang, S.-x., Zhu, M.-l., Yin, Y.-l. ve Li, P. (2023). Perillaldehyde improves diabetic cardiomyopathy by upregulating miR-133a-3p to regulate GSK-3β. *European Journal of Pharmacology*, 953, 175836. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175836

Zhang, D., Pan, A., Gu, J., Liao, R., Chen, X. ve Xu, Z. (2023). Upregulation of miR-144-3p alleviates Doxorubicin-induced heart failure and cardiomyocytes apoptosis via SOCS2/PI3K/AKT axis. *Chemical Biology & Drug Design*, 101,(1), 24-39. https://doi.org/10.1111/cbdd.14104

Zhang, J., Zhou, W., Liu, Y., Liu, T., Li, C. ve Wang, L. (2018). Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3. *Oncology letters*, 15,(5), 7215-7220. https://doi.org/10.3892/ol.2018.8217

Zhang, M.-W., Shen, Y.-J., Shi, J. ve Yu, J.-G. (2021). MiR-223-3p in cardiovascular diseases: a biomarker and potential therapeutic target. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, 610561. https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.610561

Zhang, Y., Lin, X., Chu, Y., Chen, X., Du, H., Zhang, H., Xu, C., Xie, H., Ruan, Q., Lin, J., Liu, J., Zeng, J., Ma, K. ve Chai, D. (2021). Dapagliflozin: a sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor, attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrotic remodeling by regulating TGFβ1/Smad signaling. *Cardiovascular diabetology*, 20,(1), 121. https://doi.org/10.1186/s12933-021-01312-8

Zhao, X., An, X., Yang, C., Sun, W., Ji, H. ve Lian, F. (2023). The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, 1149239. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1149239

Zhou, Q., Lv, D., Chen, P., Xu, T., Fu, S., Li, J. ve Bei, Y. (2014). MicroRNAs in diabetic cardiomyopathy and clinical perspectives. *Frontiers in Genetics*, 5. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00185

Zhou, Y., Richards, A. M. ve Wang, P. (2019). MicroRNA-221 Is Cardioprotective and Anti-fibrotic in a Rat Model of Myocardial Infarction. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 17, 185-197. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.05.018

Zhu, Y., Zhang, J. L., Yan, X. J., Sun, L., Ji, Y. ve Wang, F. F. (2022). Effect of dapagliflozin on the prognosis of patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention. *Cardiovasc Diabetol*, 21,(1), 186. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01627-0