

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİABETİN β_3 -ADRENOSEPTÖR ARACILI KARDİYAK
YANITLAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Gizem KAYKI

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. V. Melih ALTAN**

2009-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak KABUL EDİLMİŞTİR.

Tez Savunma Tarihi: 22/06/2009

Jüri Başkanı

Prof.Dr.V. Melih ALTAN

Üye

Prof.Dr. Nurettin ABACIOĞLU

Üye

Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Üye

Prof.Dr. Alper İSKİT

Üye

Prof.Dr.A.Tanju ÖZÇELİKAY

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	x
ÇİZELGELER	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırılması	1
1.1.2. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	3
1.1.2.1. Mikrovasküler Komplikasyonlar	5
1.1.2.2. Makrovasküler Komplikasyonlar	6
1.1.2.3. Diabetik Kardiyomyopati	7
1.2. Sempatik Sinir Sistemi	10
1.2.1. Kardiyak β - Adrenoseptörler	10
1.3. β_3 - Adrenoseptörler	12
1.3.1. β_3 - Adrenoseptörlerin Yapısı ve Özellikleri	12
1.3.2. β_3 - Adrenoseptörler Farmakolojisi	14
1.3.2.1. Agonistler	14
1.3.2.2. Antagonistler	15

1.3.3. Kalpteki β_3 -Adrenoseptörler	15
1.3.3.1. Kontraktil Etkileri	15
1.3.3.2. Elektrofizyolojik Etkileri	18
1.3.3.3. Sinyal Yolakları	20
1.3.3.4. Kardiyovasküler Patolojilerdeki Yeri	22
1.3.3.4.1. Kalp Yetmezliği	22
1.3.3.4.2. Hipertansiyon	25
1.3.3.4.3. Koroner Arter Hastalığı	25
1.3.3.4.4. Diabetes Mellitus	26
1.4. AMAÇ	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1.Kullanılan Gereçler	29
2.1.1. Malzemeler	29
2.1.2. Kimyasal maddeler	31
2.1.3. Deney hayvanları	32
2.2. Kullanılan Yöntemler	32
2.2.1. Deneysel Diabetin Oluşturulması	32
2.2.2. Deney Grupları	33
2.2.3. <i>In-vivo</i> Hemodinamik Ölçümler (Millar Kateterizasyonu)	33
2.2.4. İzole Organ Banyosu Deneyleri (Langendorff Kalp Preparatı)	34
2.2.4.1. BRL 37344 Konsantrasyon-Yanıt Çalışmaları	35
2.2.4.2. BRL 37344 ve Nadolol Konsantrasyon-Yanıt Çalışmaları	35
2.2.4.3. BRL 37344 ve SR 59230A Konsantrasyon-Yanıt Çalışmalar	35

2.2.5. Total RNA Ekstraksiyonu	35
2.2.5.1. Total RNA jeli	36
2.2.5.2. RT-PCR	37
2.2.5.3. PCR	38
2.2.5.4. Jel Elektroforezi	39
2.3. İstatistiksel Analiz	40
3. BULGULAR	41
3.1. Ratların Genel Özellikleri	41
3.2. <i>In Vivo</i> Ölçümler	43
3.3. İzole Organ Banyosu Deneyleri	46
3.3.1. BRL 37344 Konsantrasyon-Yanıt Çalışmaları	46
3.3.2. BRL 37344 ve Nadolol Konsantrasyon-Yanıt çalışmaları	48
3.3.3. BRL 37344 ve SR 59230A Konsantrasyon-Yanıt çalışmaları	49
3.4. β_3 -AR Altıpi, Gi α 2 ve eNOS mRNA Ekspresyonları	50
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	89

ÖNSÖZ

Kardiyovasküler komplikasyonlar diyabetik hastalarda en önde gelen morbidite ve mortalite nedenidir. Öte yandan, kardiyak fonksiyonların düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynayan β -adrenoseptörlerden yakın zamanda tanımlanan β_3 -AR alttipinin aracılık ettiği negatif inotropik etki nedeniyle diyabetik kardiyomiyopatide kardiyak fonksiyonların bozulmasına yolaçabileceği öne sürülmüştür. Bu noktadan yola çıkarak, çalışmamızda diyabetik ratlarda kardiyak β_3 -adrenoseptör stimülasyonunun kardiyak performansın bozulmasına yaptığı olası katkı araştırılmıştır. Bu çalışmanın, β_3 -adrenoseptörlerin normal ve patolojik koşullardaki rolünün belirlenmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Çalışmalarım boyunca bana her konuda destek olan ve güvenen, yalnızca zekası, deneyimi ve birikimi ile mesleki olarak değil, her konuda sahip olduğu engin bilgisiyle entelektüel olarak da gelişmemde çok büyük rolü olan, sabrı, hoşgörüsü ve hassasiyeti için minnettar olduğum, öğrencilik yıllarımda tek gelecek planımın asistanı olmak olduğu ve mezun olduğumda bunu başardığım için çok mutlu ve gururlu olduğum, çok daha uzun yıllar birlikte çalışmak istediğim Prof. Dr. V.Melih Altan'a,

Bilgi ve deneyimleri ile hep bana yol gösteren, sayesinde ilk laboratuvar çalışmalarımı yaptığım, kendisinden bilimsel merak başta olmak üzere birçok şey öğrendiğim Prof.Dr. A.Tanju Özçelikay'a,

Desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen anabilim dalımız öğretim üyeleri Prof.Dr. Nuray Arı, Prof.Dr. Gülgün Ozansoy, Prof.Dr. Serap Gür ve Doç.Dr. Arzu Onay Beşikçi'ye,

Çalışkanlığı ve disiplinli oluşunu örnek aldığım, her zor anımda yanımda olan, beni benden çok düşünen, beraber kurstan kursa koştururken aramızdaki bağın hiç kopmamacasına güçlendiği, birlikte daha çok bilimsel başarılar ve güzel anılar yaşayacağımıza emin olduğum Dr. Ebru Arioğlu'na,

Varlığıyla hepimizin hayatını kolaylaştıran, kendinden çok bizleri düşünen, başka bir ülkede bile olsa ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, çalışkanlığına hayran olduğum, renkli kişiliğiyle neşe kaynağımız olan Uzm. Ecz. Işıl Özakca'ya,

Dostluklarını ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte çalışmaktan dolayı çok mutlu olduğum Dr. Şahika Güner, Uzm. Ecz. Hande Altunkaynak ve Ecz. Tuğçe Yıldız'a,

Çalışmalarım süresince hayatımı kolaylaştıran, yaşamımı güzelleştiren ve anlamlı hale getiren Barış Mutlu'ya,

Mezun olduğum gün bana ilk danışmanlık yaptığı tezi hediye etmesiyle başlayan akademik hayattaki desteğini benden esirgemeyen, ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, her zaman örnek aldığım canım dayım Doç.Dr. Kaya Yorgancı'ya,

Bana olan güven ve sevgileriyle her zaman yanımda olan, beni bu günlere getirmek için büyük emek sarfeden, onlara layık olabilmek için çalıştığım, destekleri olmaksızın hiçbir şey yapamayacağım, varlıklarıyla yaşantımı güzelleştiren mükemmel ailem, annem, babam ve kardeşime,

Yüksek lisans eğitimim boyunca sağlamış oldukları burs nedeniyle TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na

TEŞEKKÜR EDERİM.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	A denosine TriP hosphate
AGE	A dvanced G lycosylation E nd P roduct
cAMP	C yclic A denosine M ono P hosphate
cDNA	C omplementary D N
cGMP	C yclic G uanosine M ono P hosphate
eNOS	E ndotelyal N itrik O ksid S entaz
G _i	İ nhibitör etkinliktteki G proteini
GMP	G uanine M ono P hosphate
GPCR	G - P rotein C oupled R eceptor
GRK	G protein R eseptör K inaz
G _s	S timülatör etkinliktteki G proteini
GTP	G uanosine TriP hosphate
L-NMMA	L -N ^G - M ono M ethyl A rginin M onoasetat
LVDP	L eft V entricular D eveloped P ressure
LVEDP	L eft V entricular E nd D iastolic P ressure
LVP	L eft V entricular P ressure
mRNA	M essenger R ibo N ucleic A cid
PKA	P rotein K inaz A
PKC	P rotein K inaz C
PPAR	P eroksizom P rolifere- A ktive R eseptör
SerCa2	S arco(e ndo)plasmic R eticulum C alcium-dependent A TPase
TGβ3	T rans G enic- Kardiyomyositlerinde insan β ₃ -AR bulunan fare
β-AR	B eta A drenerjik R eseptör

ŞEKİLLER

Şekil 1.1	Hiperglisemi kaynaklı vasküler hasarın mekanizmaları	5
Şekil 1.2	Diabetik kardiyomyopatinin gelişmesinde rol oynayan olası mekanizmalar	9
Şekil 1.3	Kalp kasında β -AR'lerin sinyal transdüksiyon kaskadları	11
Şekil 1.4	İnsan β -adrenerjik reseptörünün yapısı	13
Şekil 1.5	Kardiyomyositlerdeki β_3 -adrenoseptör sinyal yolağı	21
Şekil 1.6	Sağlıklı ve yetmezlikli kalp kasında inotropik olarak zıt etki gösteren β -AR'lerin hipotetik rolü	23
Şekil 1.7	STZ-diabetin ratlarda β -AR alttiplerinin ekspresyonları üzerindeki etkileri	27
Şekil 3.1	<i>In vivo</i> deney öncesinde ölçülen A) kan glukoz düzeyleri ve B) vücut ağırlıkları	41
Şekil 3.2	Ratların haftalık beden ağırlığı ölçümleri	42
Şekil 3.3	<i>In vivo</i> olarak ölçülen A) sol ventrikül basıncı, B) sol ventrikül diastol sonu basıncı ve C) sol ventrikül içi gelişen basınç değerleri	44
Şekil 3.4	<i>In vivo</i> olarak ölçülen dP/dt değerleri	45
Şekil 3.5	<i>In vivo</i> olarak ölçülen kalp atım hızı değerleri	45
Şekil 3.6	<i>In vivo</i> olarak ölçülen kan basıncı değerleri	46
Şekil 3.7	BRL 37344'ün konsantrasyon-yanıt eğrileri	47
Şekil 3.8	BRL 37344'ün nadolol varlığında elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	48
Şekil 3.9	BRL 37344'ün SR 59230A varlığında elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri	49
Şekil 3.10	Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik ratlarda β_3 -AR mRNA ekspresyonlarına ilişkin band yoğunlukları ve band fotoğrafları	50
Şekil 3.11	Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik ratlarda $G_{i\alpha 2}$ mRNA ekspresyonlarına ilişkin band yoğunlukları ve band fotoğrafları	51

Şekil 3.12	Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik ratlarda eNOS mRNA ekspresyonlarına ilişkin band yoğunlukları ve band fotoğrafları	52
Şekil 4.1	BRL 37344'ün kontrol (A) ve diabetik (B) ratlarda negatif inotropik etkisine ilişkin konsantrasyon-yanıt eğrisi örneği	56

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1	RT-PCR reaksiyonu bileşenleri	37
Çizelge 2.2	RT-PCR programı	37
Çizelge 2.3	PCR reaksiyonu bileşenleri	38
Çizelge 2.4	PCR programı	38
Çizelge 2.5	PCR reaksiyon koşulları	39
Çizelge 3.1	Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetiklerin sol ventrikül basıncı, sol ventrikül diastol sonu basıncı ve sol ventrikül içi gelişen basınç değerleri	43

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırılması

Diabetes mellitus pankreastan insülin saliverilmesindeki eksikliğe ya da dokuların insüline duyarlılığının azalmasına bağlı olarak karbohidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozulması ile tanımlanan metabolik bir hastalıktır. Hiperglisemi ve başka bazı biyokimyasal bulgularla tanısı konan diabetin karakteristik semptomları poliüri, polidipsi, polifaji ve kilo kaybıdır. Diabetes mellitus kronik hiperglisemi sonucu birçok organda hasara yol açan ve bunun sonucunda çok sayıda komplikasyona neden olan bir sendromdur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün raporları doğrultusunda 2000 yılında dünya genelinde 171 milyon, Türkiye'de 2.9 milyon olan diabetik hasta sayısının 2030 yılında dünya genelinde 366 milyon, Türkiye'de ise 6.4 milyon kişiye ulaşacağı öngörülmektedir (WHO, 2008). Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde tedavi giderleri için 2007 yılında 174 milyar dolar harcanan ve nüfusun %8'ini oluşturan tanısı konmuş 17.9 milyon, tanısı konmamış 5.7 milyon diabet olgusu bulunmaktadır (American Diabetes Association). İlk olarak WHO tarafından 1980'de yapılan Tip 1 diabetes mellitus (insülin-bağımlı diabet ya da IDDM) ve Tip 2 diabetes mellitus (insülin-bağımsız diabet ya da NIDDM) şeklindeki sınıflandırmanın dışında gestasyonel diabet, pankreas β hücrelerinde ya da insülin aktivitesindeki genetik defektler, ekzokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, ilaçlar, infeksiyonlar, immün sistem bozuklukları, diabetle ilişkili genetik hastalıklarla indüklenen diabet tipleri de bulunmaktadır (Diabetes Care, 2008).

Tedavi edilen diabet olgularının %5-10'unu oluşturan tip 1 diabet, pankreastaki β hücrelerinin hasarı nedeniyle insülin üretiminin yokluğu durumudur. Genellikle çocukluk ya da ergenlik döneminde birdenbire ortaya çıkmaktadır (Diabetes Care, 2008). Amerikan Diabet Derneği (American Diabetes Association, ADA)'nin yaptığı

sınıflandırmaya göre tip 1 diabetin iki farklı türü vardır: Tip 1A diabet pankreas Langerhans adacıklarındaki β hücrelerine karşı otoantikor gelişimiyle ilişkili olmasına karşın, tip 1B diabetin nedeni belli değildir. Genellikle Afrika ve Asya ırklarında gözlenen tip 1B diabette insülin eksikliği ve ketoasidoza eğilim olmasına karşın otoimmüniteye ilişkin bir kanıt bulunmamaktadır. Tip 1 diabetin genel karakteristiği olan insülin eksikliği sonucunda glukozun vücut hücreleri tarafından kullanımı azalır ve glukoz üretimi artar. Buna bağlı olarak yükselen kan glukoz düzeyi glukozun idrarla kaybına neden olur. Glomerüler filtrat içinde böbrek tubuluslarına gelen glukoz konsantrasyonu geri emilen düzeyi aştığında glukozun fazlası idrarla atılır. Glukozun idrarla kaybına ek olarak glukozun doğrudan hücreyi dehidrate edici etkisi osmotik diüreze neden olur. Böylece diabetin klasik semptomları poliüri ve polidipsi ortaya çıkar. Diabette karbohidrat metabolizmasının yağ metabolizmasına kayması sonucu ketoasid konsantrasyonları artar. Böylece asid ve idrar miktarının artması sonucu gelişen dehidratasyona bağlı olarak şiddetli metabolik asidoz ortaya çıkar. Bu durum tedavi edilmediğinde diabetik koma ve ölümle sonuçlanır. Diabette glukozun enerji için kullanılamaması, yağların kullanımını artırır, proteinlerin depolanmasını ise azaltır. Böylece tedavi edilmeyen diabetik hasta polifajisi olmasına karşın hızlı kilo kaybeder. Kronik hiperglisemi doku hasarına neden olur. Birçok dokuda damarların fonksiyonu bozulur ve yapısal değişiklikler ortaya çıkar. Periferik nöropati ve otonom sinir sistemi bozuklukları, renal hasara ikincil olarak gelişen hipertansiyon ve lipid metabolizmasındaki bozukluklara ikincil olarak gelişen ateroskleroz sık rastlanan komplikasyonlardır. (Guyton and Hall, 2001)

Tip 2 diabet ise hedef dokuların insülinin metabolik etkilerine duyarlılıklarının azalmasından kaynaklanan insülin rezistansı ya da relatif insülin eksikliğine bağlı olarak ileri yaşlarda ortaya çıkar. Tip 2 diabet, tüm diabet olgularının %90-95'ini kapsamaktadır (National Diabetes Fact Sheet, 2007). Tip 2 diabetiklerin çoğunda obezite ya da abdominal yağlanma söz konusudur. Tip 1 diabetin tersine tip 2 diabette plazma insülin konsantrasyonları artmıştır. Ne var ki, artan insülin konsantrasyonları bile insülin duyarlılığı ileri derecede düşük olan periferik dokularda glukoz regülasyonu için yeterli olamamaktadır. Hipergliseminin yavaş ilerlediği tip 2 diabet uzun yıllar teşhis edilememekte, bu nedenle de makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyon riski artmaktadır (Diabetes Care, 2008).

Bir başka diabetes tipi olan gestasyonel diabetes, hamilelik sırasında ortaya çıkan glukoz intoleransı durumudur. Gestasyonel diabetesi olan hastaların %5-10'unda ileri dönemlerde tip 2 diabetes gözlenmektedir (National Diabetes Fact Sheet, 2007).

Diğer diabetes ve hiperglisemi türleri ise spesifik genetik bozukluklar, cerrahi müdahale, ilaçlar, infeksiyonlar, pankreas bozuklukları ve diğer hastalıklara ikincil olarak gelişmektedir. Bu türler tanı konan diabetesli olguların %1-5'ini oluşturmaktadır (National Diabetes Fact Sheet, 2007).

1.1.2. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diabetesli hastalarda süreç içinde çok sayıda akut ya da kronik komplikasyon oluşmaktadır. Etkin tedavi uygulanmayan, bir başka anlatımla, kan şekeri iyi kontrol edilemeyen hastalarda gözlenen akut komplikasyonlardan en önemlileri ketoasidoz ve hiperozmolar (nonketotik) komadır. Kronik komplikasyonlar ise mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olmak üzere iki grupta incelenebilir (Retnakaran ve Zinman, 2008). Hipergliseminin neden olduğu vasküler komplikasyonların temelinde şu dört mekanizmanın yer aldığı öne sürülmüştür (Şekil 1.1) (Brownlee, 2001).

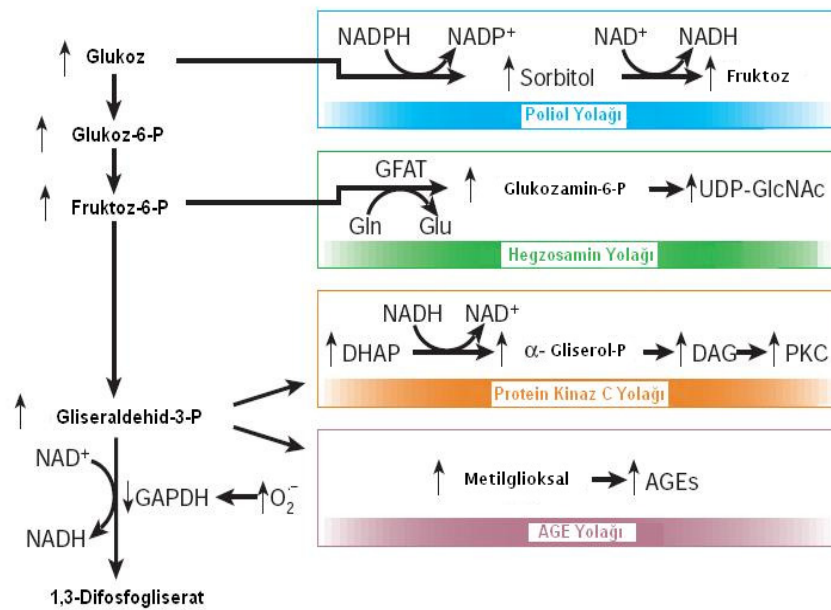
1. Poliol yolağı: Poliol yolağının ilk enzimi olan aldoz redüktaz, periferik sinirler, lens, böbrek papillası gibi dokularda bulunur ve glukozdan sorbitol sentezlenmesinde rol oynar. Sorbitol ise yolağın ikinci enzimi olan sorbitol dehidrogenaz ile fruktoza dönüştürülür. Normoglisemi durumunda hücresel glukoz heksokinaz tarafından glukoz-6-fosfata dönüştürüldüğünden poliol yolağına giren glukoz konsantrasyonu düşüktür (Altan, 2003). Glukoz konsantrasyonlarının arttığı durumlarda ise heksokinaz doygunluğa ulaşır ve poliol yolağına giren glukoz konsantrasyonu yükselir. Buna ek olarak, aldoz redüktaz aktivitesi artar, sorbitol dehidrogenaz aktivitesi ise azalır. Bütün bunların sonucu olarak hücre içi sorbitol konsantrasyonları belirgin olarak yükselir. Çok yüksek su çekici özelliği olan sorbitol hücre ödemi ve hasarına yol açar. Öte yandan, artan poliol aktivitesi myoinozitol konsantrasyonlarının azalmasına neden olur. Glukoz, ortamda fazla miktarda bulunduğu kendisine yapıcı çok benzeyen myoinozitol taşıyıcılarıyla yarışmaya girerek hücre içine myoinozitol transferini engeller. Hücre içi myoinozitolün azalması fosfoinozid metabolizmasını bozar ve Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azalmasına yol

açar. Azalan Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi sinir liflerinde iletim hızının azalmasına neden olur (Hacettepe İç Hastalıkları Ders Kitabı).

2. Non-enzimatik glikasyon yolağı: Glukoz nonenzimatik bir mekanizma aracılığıyla proteinlerle birleşerek glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen nonenzimatik glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur (Altan, 2006). Glikasyon ürünleri, doğal olarak, kan glukozu düzeyleri yükselince artar, normalleşince azalır. Bunun en tipik örneğı HbA1C'dir. Uzun yaşamlı yapısal proteinler ise post amadori glikasyon reaksiyonuna uğrayarak ileri glikasyon son ürünlerine [Advanced Glycosylation End Products (AGEs)] dönüşürler. Bunlar yaşam boyunca ve hiperglisemi süresince giderek artarak damar endoteli, ekstraselüler matriks, glomerül bazal membran ve aksonlarda birikir. Biriktikleri dokularda kalitatif ve kantitatif değişikliklere neden olurlar. AGEler çeşitli hücrese fonksiyonları spesifik reseptörleri aracılığıyla değıştirirler. AGE proteinin makrofajdaki reseptörlerle etkileşmesi ile makrofajlardan tümöz nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) sentezi ve salınımı artar. Bunlar endotel, bağ dokusu ve düz kas hücre proliferasyonunu arttırırlar. Bir başka AGE reseptörü endotel hücrelerinde bulunur. AGElerin bu reseptörle bağlanması endotel hücrelerinde koagülasyon yönünden önemli uyarıların ortaya çıkmasına ve potent bir vazokonstriktör peptid olan endotelin-1 salınmasına yol açar. Vazokonstriksiyon ve fokal tromboz damar lezyonunu daha da arttırır. Bu hipoksik uyarı serbest oksijen radikallerinin yapımını tetikler. Serbest radikaller oluştukları dokularda ciddi hasara neden olan maddelerdir (Hacettepe İç Hastalıkları Ders Kitabı).

3. PKC aktivasyonu: Hücrese hiperglisemiyle mikrovasküler hücrelerde, retinal ve renal glomerüllerde DAG konsantrasyonlarının arttığı gözlenmiştir. Bu artış iyon değışim düzenlenmesi, hormon, nörotransmitter salınımı, hücre proliferasyonu gibi birçok yaşamsal fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan protein kinaz C (PKC) aktivitesinin artmasına neden olur (Hiramatsu ve ark., 2002). PKC aktivitesindeki artış ise retinal ve renal kan akımı bozukluklarına yol açar (Ishii ve ark., 1996). Sözü edilen bozuklukların nitrik oksid üretiminin azalmasına ve endotelin-1 aktivitesinin artmasına bağlı olabileceğı düşünülmektedir (Craven ve ark., 1994).

4. Heksozamin yolağı: Heksozamin yolağında Fruktoz-6-fosfat bir dizi reaksiyonla son ürün olan UDP-N-asetilglukozamine dönüşür (Brownlee, 2001). Heksozamin yolağı aktivasyonunun kardiyomyositlerdeki sarkoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz ekspresyonunun azalmasına, damar düz kas hücreleri ve aortik endotel hücrelerinde dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 indüklenmesi gibi diabetes komplikasyonlarına aracılık ettiği düşünülmektedir. Buna ek olarak, çok sayıda çalışmada heksozamin yolağının insülin rezistansı ile de yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Buse, 2006).



Şekil 1.1. Hiperglisemi kaynaklı vasküler hasarın mekanizmaları (Brownlee, 2001)

1.1.2.1. Mikrovasküler Komplikasyonlar

Mikrovasküler komplikasyonlar, tüm vücuttaki kapiller damarları etkileyen problemlerdir. Diabetesin şiddetine ve süresine bağlı olarak oluşma riski artar. En sık gözlenen mikrovasküler komplikasyonlar retinopati, nefropati ve nöropatidir (Zimmerman R., 2005).

Retinopati, en önde gelen körlük nedenleri arasındadır. Non-proliferatif ve proliferatif olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Non-proliferatif retinopatiler mikroanevrizma, retina içi

kanama, sert eksüda, retinal ödem ile karakterizedir. En önemli belirtisi neovaskülarizasyon olan proliferatif retinopatilerde ise yeni damarlanma dışında vitröz kanama, pamuk görünümlü noktalar gözlenmektedir. Proliferasyon devam ederse vitröz kanama sonrasında körlük oluşabilir (Fowler MJ., 2008).

Böbrek yetmezliğinin en önemli nedeni olan diabetik nefropati, 24 saat içinde 500 mg'dan fazla proteinüri ve renal fonksiyonlarda azalmayla kendini gösterir. Nefropatinin en erken bulgularından biri olan mikroalbuminüride idrarla günlük 30-300 mg albumin atılır. Buna ek olarak, glomerüler membranda kalınlaşma, mikroanevrizma oluşumu ve nodüler ilerleyici glomeruloskleroz (Kimmelsteil-Wilson) gözlenir. Kan şekerini düşürmeye yönelik tedaviye ek olarak antihipertansif ajanlarla tedavi de nefropatide yararlı olmaktadır (Gross ve ark., 2005).

En sık gözlenen komplikasyonlardan biri olan diabetik nöropati ise periferik sinirlerin hasara uğraması durumudur. Duyusal, fokal/multifokal ve otonomik nöropatiler olmak üzere çeşitli tipleri vardır. Duyusal sinirlerin hasarı sonucunda el ve ayaklarda uyuşukluk, hissizlik oluşur. Ağrı ve sıcaklığın algılanması azalabilir hatta tümüyle ortadan kaybolabilir. Otonom sinirlerin etkilenmesi sonucunda ise gastrointestinal sistem fonksiyonlarının bozulması, erektil disfonksiyon, sessiz myokard iskemisi gibi birçok organı etkileyen komplikasyonlar gözlenir (Boulton ve ark., 2005).

1.1.2.2. Makrovasküler Komplikasyonlar

Makrovasküler komplikasyonlar koroner, serebral ve periferik arterlerde gözlenir (Retnakaran ve Zinman, 2008). Makrovasküler hastalıkların temel nedeni olduğu düşünülen aterosklerozun arter duvarlarının hasarı ya da kronik inflamasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda okside düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) partikülleri endotel hücrelerinde birikirler. Arter duvarındaki monositler makrofajlara dönüşürler ve okside lipidlerle birleşerek köpük hücreleri oluştururlar. Oluşan bu hücreler makrofaj proliferasyonunu stimüle eder ve T lenfositleri uyarır. T lenfositleri ise düz kas proliferasyonuna ve kollajen birikmesine neden olur. Bunun sonucunda fibröz başlıklı lipidlerden zengin bir aterosklerotik lezyon oluşur. Buna ek olarak, trombosit birikiminin artması, hiperkoagülabilité, nitrik oksid (NO) oluşumunda azalma, trombositlerde serbest oksijen radikalleri

oluşumunda artma ve kalsiyum regülasyonundaki değişiklikler de trombosit agregasyonuna neden olmaktadır (Boyle PJ, 2007).

Kardiyovasküler hastalıklar hem tip 1 hem de tip 2 diabetik ölümlerin başlıca nedenidir (Fowler, 2008). Makrovasküler komplikasyonlardan koroner kalp hastalıklarının diabetle ilişkili olduğu ilk olarak Framingham çalışmasında olmak üzere çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Kannel ve McGee, 1979). Tip 2 diabetik hastalarda gözlenen metabolik sendrom, abdominal obezite, hipertansiyon, hiperlipidemi gibi faktörler kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini arttırmaktadır (Almdal ve ark., 2004).

Diabet ayrıca inme ve serebrovasküler hastalık riskini de önemli ölçüde arttırmaktadır (Lehto ve ark., 1996). Tip 2 diabetik hastalarda inme riskinin %150-400 kat arttığı bildirilmiştir. İnmeye bağlı demans, inme yinleme olasılığı ve inmeye bağlı ölümlerin de diabetik hastalarda arttığı gözlenmiştir (Beckman ve ark., 2002).

1.1.2.3. Diabetik Kardiyomyopati

Kardiyovasküler komplikasyonlar diabetik morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. İlk olarak 1972 yılında Rubler ve arkadaşlarının tanımladıkları diabetik kardiyomyopati, koroner arter hastalıkları, kapakçık hastalıkları ve hipertansiyondan bağımsız olarak diabetin kardiyak yapı ve fonksiyonları etkilemesi sonucu oluşan ventriküler disfonksiyon durumudur (Farkouh ve ark., 2008). Diabetik kardiyomyopati aslında tek başına bile konjestif kalp yetmezliğine neden olabilir. Ne var ki, hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları ve diğer kardiyovasküler komplikasyonlarla birlikte bulunduğu kalp yetmezliği riski önemli ölçüde artar. Prevalansı gün geçtikçe artan diabetik kardiyomyopati diabetik hastaların %40-60'ında görülmektedir (Bell, 2003).

Klinik çalışmalarda diabetik kardiyomyopatinin erken dönemde ortaya çıkan en önemli göstergesinin diastolik disfonksiyon olduğu bildirilmiştir (Ruddy ve ark., 1988; Shivalkar ve ark., 2006). Strong Heart çalışmasında diastolik disfonksiyonun sıklığı ve derecesinin HbA1C düzeyleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Devereux ve ark., 2000). Bunun en önemli nedeni myokarda AGEs birikmesidir. Diabetik hayvanlarda AGEs reseptör ekspresyonunun artmasıyla kollajen çapraz bağlanması ve myokardial

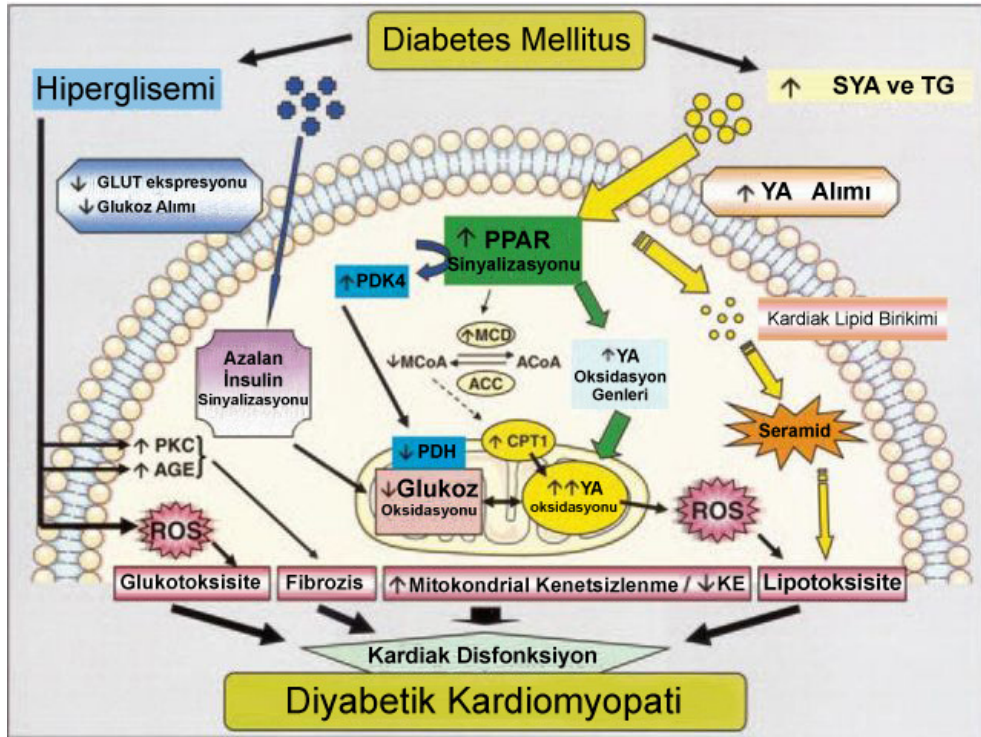
fibrozis artmaktadır (Candido ve ark., 2003). Kollajen miktarının artması myokardiyal sertliğe (myocardial stiffness) ve kasılabilirliğin azalmasına yol açmaktadır (Avendano ve ark., 1999; Berg ve ark., 1999).

Diabetik kardiyomyositlerde ATPaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak kalsiyum ve diğer iyon dengeleri değişmektedir (Cesario ve ark., 2006). Sarkoplazmik retikulumun (SR) kalsiyum salım ve geri alım hızı, SR Ca^{+2} -ATPaz ve ryanodin reseptör proteini ekspresyonları azalmaktadır (Choi ve ark., 2002). Değişen kalsiyum dengesi myokardiyal disfonksiyona neden olmaktadır (Boudina ve Abel, 2007).

Diabetik kalplerde angiotensin II reseptör yoğunluğu ve mRNA ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (Fiordaliso ve ark., 2000; Christlieb ve ark., 1979). Artan renin-angiotensin sistem aktivitesi oksidatif hasarın artmasına, kardiyomyosit ve endotel hücrelerinde apoptozis ve nekroze neden olmaktadır (Frustaci ve ark., 2000). Hiperglisemi sonucu artan protein kinaz C (PKC) aktivitesinin de myokardiyal nekrozis, fibrozis ve ventriküler disfonksiyona neden olduğu deneysel çalışmalarda belirlenmiştir (Wakasaki ve ark., 1997). Buna ek olarak, artan myokardiyal serbest radikal ve oksidan içeriğinin nitrik oksid düzeylerini azaltarak endotelial fonksiyonu kötüleştirdiği ve myokardiyal inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir (Szabo ve ark., 2002).

Sağlıklı bir kalp, enerjisinin %20-40'ını karbohidratlardan, %60-80'ini ise yağ asidi metabolizmasından üretir. Ne var ki, diabetik bir kalp enerji kaynağı olarak neredeyse tümüyle yağ asitlerini kullanır (Chatham ve ark., 1996). Diabetik myokarda glukoz kullanımının azalması, glukoz taşıyıcı proteinlerin ve mRNA düzeylerindeki azalmanın bir sonucu olarak oluşur (Severson DL., 2004). Serbest yağ asitleri peroksizom proliferatörünü aktive edici reseptörlerle (PPAR- α) bağlanarak onları aktive eder (Sharma ve McNeill, 2006). PPAR- α 'ların aktivasyonu piruvat dehidrogenazı inhibe ederek myokardiyal enerji üretiminin azalmasına neden olur. Bu da apoptozisi hızlandıran glukoz metabolizması ara ürünlerinin ve seramidin hücre içinde birikmesine neden olur (Eckel ve ark., 1990; Liedtke ve ark., 1988). Serbest yağ asitleri metabolizması sonucu oluşan toksik ara ürünler (lipotoksisite) myosit kalsiyum dengesini ve dolayısıyla da myokard fonksiyonunu bozar (Malhotra ve ark., 1997; Abe ve ark., 2002).

Kardiyomyopatide oluşan myokard hipertrofisi, fibrozis gibi patolojik değişikliklerin oluşmasında temel nedenin hiperglisemi olduğu bilinmektedir (Farkouh ve ark., 2008) Bununla birlikte, her yeni deneysel ve klinik çalışmada diabetik kardiyomyopatiye yol açan moleküler ve patofizyolojik mekanizmalar daha fazla aydınlatılmakta ve yeni tedavi seçenekleri de gündeme gelmektedir (Boudina ve Abel, 2007) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Diabetik kardiyomyopatinin gelişmesinde rol oynayan olası mekanizmalar (Boudina ve Abel, 2007)

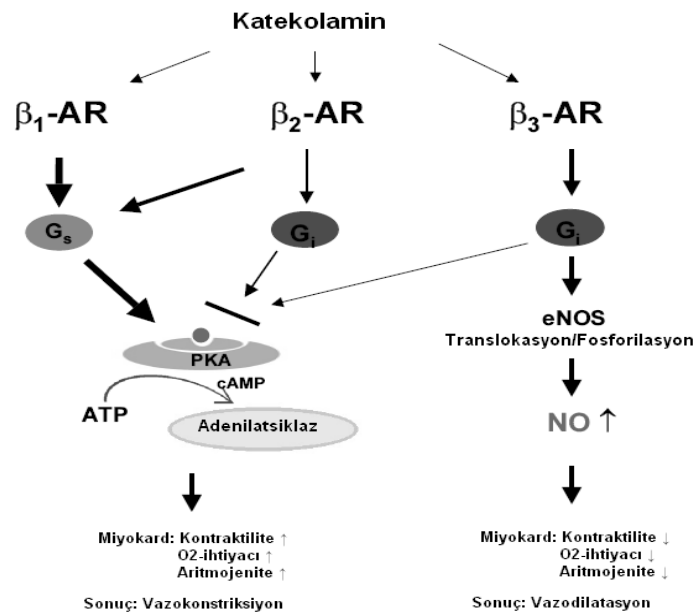
1.2. Sempatik Sinir Sistemi

Kardiyovasküler sistemin nörohumoral düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan sempatik sinir sistemi dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen çok sayıda kardiyovasküler hastalıkla ilişkilidir. Sempatik sinir sistemi etkinliğine aracılık eden adrenerjik reseptörler ilk kez 1948'de Ahlquist tarafından α ve β olmak üzere sınıflandırılmıştır. Daha sonra β -ARler 1967'de β_1 - ve β_2 - adrenoseptörler (AR) olmak üzere iki alttıpe ayrılmıştır (Lands ve ark., 1967). 1989 yılında ise L.J. Emorine ve arkadaşları tarafından yeni bir β -AR alttıpi olan β_3 -AR'nin tanımlanmasının ardından günümüzde kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR olmak üzere en az 3 AR alttipinin rol aldığı düşünülmektedir. Buna ek olarak, kalpte dördüncü bir β -AR alttipinin (putatif β_4 -AR) varlığı da gösterilmiştir (Kaumann ve Molenaar, 1997).

1.2.1. Kardiyak β - Adrenoseptörler

Kardiyak dokuda β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR'lerin bulunduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Wilson ve ark., 1984; Dincer ve ark., 2001). Bu alttıpler klonlanmış ve farmakolojik olarak tanımlanmıştır. β -AR'lerin temel işlevi akut ya da kronik stres durumlarında kardiyak performansın artırılmasıdır. Kısa bir süre öncesine kadar kalpte yalnızca β_1 -/ β_2 - AR'lerin bulunduğu ve oranlarının da yaklaşık 4/1 olduğu bilinmekteydi (Bristow ve ark., 1986). Her iki alttipin de insanda β -agonistlerin kardiyak yanıtlarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Brodde ve Michel, 1999; Zerkowski ve ark., 1986). Bu iki reseptörün de uyarılması kalpte pozitif inotropik ve kronotropik etkilere neden olur. Yedi transmembran segmentli G-protein kenetli reseptör ailesinden olan β -AR'lerden β_1 - ve β_2 - alttıpleri G_s proteini ile kenetlidirler. Bu kenetlenme adenilat siklaz enzim aktivitesi sonucu hücre içinde siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeylerinin artmasına neden olur. cAMP miktarının artması, kardiyak fonksiyon için gerekli olan L-tipi kalsiyum kanalları (Zhao ve ark., 1994; Gerhandstein ve ark., 1999), fosfolamban (Simmerman ve Jones, 1998), troponin I (Sulakhe ve Vo, 1995), ryanodin reseptörleri (RyR) (Marx ve ark., 2000) gibi çeşitli proteinleri fosforile eden protein kinaz A (PKA)'ı aktive eder. PKA-aracılı fosforilasyon yukarıda sayılan proteinlerin aktivitesini değiştirerek fonksiyonel bir yanıtı yol açar. L-tipi kalsiyum kanallarının fosforilasyonu Ca^{++} 'un hücre içine

alınımını arttırarak kontraksiyonun artmasını; fosfolambanın fosforilasyonu ise sarkoplazmik retikuluma Ca^{++} alınımını arttırarak diastolik gevşemenin hızlanmasını sağlar. Troponin I'nın PKA aracılı fosforilasyonu myofilamentlerin Ca^{++} 'a olan duyarlılığını arttırır. RyR reseptörleri de PKA tarafından fosforile edilir, fosforilasyondaki değişiklikler kalp yetmezliğinin patogeneğinde rol oynar (Marx ve ark., 2000). β_1 -AR'lerin yalnızca G_s ile kenetlenmesine karşın β_2 -ARler kardiyomyositlerde pertussis toksin-duyarlı G_i ile de kenetlenebilirler (Kuschel ve ark., 1999). β_1 -AR'lerin kronik olarak uyarılması fare kardiyomyositlerinde apoptoza neden olur (Zhu ve ark., 2003), β_2 -ARlerin stimülasyonu ise genellikle anti-apoptotik etki gösterir. Kalpteki β_1 -AR'lerin, çoğunluğu oluşturduğu için, kardiyak performansın düzenlenmesinde en önemli rolü oynadığı, β_2 -AR'lerin ise daha kısıtlı fonksiyonları olduğu düşünülmektedir. Klasik β_1 - ve β_2 -AR'lerin tersine β_3 -AR'lerin uyarılması ise negatif inotropik etkiye aracılık eder (Gauthier ve ark., 1996). Kalpte pozitif inotropik etkiye aracılık eden dördüncü bir adrenoseptör alttipi olan putatif β_4 -AR'lerin β_1 -/ β_2 -AR geni çıkartılmış farelerde yapılan deneylerde β_1 -AR'ün düşük afiniteli bölgesi olduğu öne sürülmüştür (Kaumann ve ark., 2001). Sözü edilen tüm β -AR alttiplerinin kardiyomyositlerde bulunduğu saptanmış, ne var ki, Şekil 1.3'te gösterildiği gibi her alttipin sinyal yolları ve fonksiyonel özelliklerinin farklı olduğu belirlenmiştir (Steinberg, 1999).



Şekil 1.3. Kalp kasında β -AR'lerin sinyal transdüksiyon basamakları. PKA, protein kinaz A, eNOS, endotelial nitrik oksid, NO, nitrik oksid (Pott ve ark., 2006).

1.3. β_3 - Adrenoseptörler

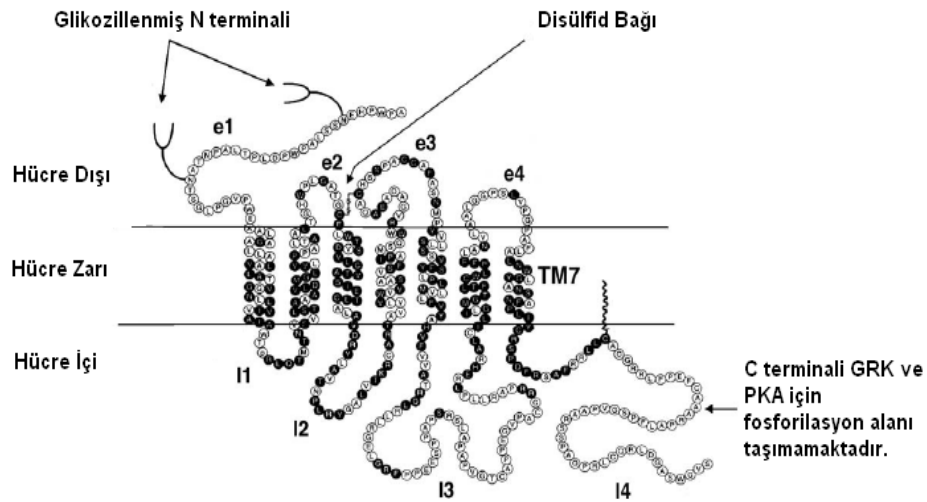
β_3 -AR'ler moleküler yapısı ve farmakolojik özellikleri açısından β_1 -AR ve β_2 -AR alttiplerinden ayrılırlar. Esas olarak adipoz dokuda bulunan β_3 -AR'lerin (Lowell ve Spiegelman, 2000) katekolaminler tarafından aktivasyonu beyaz adipositlerde lipolizise, kahverengi adipositlerde ise termogenezise aracılık eder. Çok sayıda dokuda varlığı gösterilen β_3 -AR'lerin ayrıca, ileum ve kolonda kasılmayı inhibe ettikleri (Bond ve ark., 1988; Koike ve ark., 1994), nöronal bronkomotoru modüle ederek havayolu düz kas hücrelerinde gevşemeye aracılık ettikleri (Martin ve Advenier, 1995), deri ve yağ başta olmak üzere periferik vazodilatasyon oluşturdıkları (Berlan ve ark., 1994; Shen ve ark., 1994) bildirilmiştir. Son yıllarda ise hem sağlıklı hem de kalp yetmezliği olan bireylerden alınan kalp dokularında yapılan çalışmalarda β_3 -AR mRNA (Gauthier ve ark., 1996) ve proteinlerinin (Moniotte ve ark., 2001) saptanması kardiyak β_3 -AR'lerin fonksiyonel olduğu görüşünü güçlendirmiş, bu alttipin kardiyak ve vasküler kontraktile üzerindeki fizyolojik etkileri önem kazanmıştır.

1.3.1. β_3 - Adrenoseptörlerin Yapısı ve Özellikleri

İnsan β_3 -AR'ünü kodlayan gen ilk kez 1989'da klonlanmıştır (Emorine ve ark., 1989). Ardından yapılan çalışmalarda rat, fare, domuz, maymun, köpek, koyun ve keçide de bu reseptörü kodlayan genler bulunduğu gösterilmiştir (Strosberg, 1997; Forrest ve Hickford, 2000). β_1 - ve β_2 -AR genlerinin tersine β_3 -AR geni "intron"lar içermektedir. Ayrıca bu reseptör genindeki çeşitli "ekson"ların varlığı da alternatif bağlanma ve bunun sonucu olarak da farklı farmakolojik özelliklere sahip reseptör izoformlarının bulunabileceği olasılığını güçlendirmektedir.

β_3 -AR'ler de β_1 - ve β_2 -ARler gibi G-proteinine kenetli reseptörler ailesindendir. Bu tip reseptörler 22-28 aminoasit içeren ve 3 hücre içi, 3 hücre dışı kıvrıma sahip 7 transmembran bölge ile karakterizedir (Şekil 1.4). Tüm β -AR alttiplerinin N-terminali glikozillenmiştir ve hücre dışında yer alır. C-terminali ise hücre içinde bulunur. TM3, TM4, TM5 ve TM6 transmembran bölgeleri ligandın reseptöre bağlanabilmesi için gereklidir (Strosberg ve Pietri-Rouxel, 1996). İkinci kıvrımdaki sistein 110 ve üçüncü ekstrasellüler kıvrımdaki sistein 189 aminoasitleri arasındaki disülfid köprüsü ligand

bağlanması ve reseptör aktivitesi için gereklidir (Moffett ve ark., 1993). İnsanlarda ve ratlarda β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR'lerin amino asit dizilimleri arasında %40-50 oranında benzerlik vardır. İnsan ve rat β_3 -AR'leri %79 oranında benzerdir; en büyük benzerlik transmembran bölgelerinde (%94), en az benzerlik ise C terminal kuyruğunda ve 3.hücre içi kıvrımdadır.



Şekil 1.4. İnsan β -adrenerjik reseptörünün yapısı. Koyu renkli daireler üç alttip için de ortaktır. e: Hücre dışı bölge, i: Hücre içi bölge, TM, transmembranal bölge (Gauthier ve ark., 2000)

β_3 -AR'ler, β_1 - ve β_2 -AR'lere göre farklı düzenleyici özelliklere sahiptirler. Agonist stimülasyonu sonucu β_1 - ve β_2 -AR'lerde oluşan desensitizasyon, işgal edilen reseptörlerin fosforilasyonu, kenetsizlenmesi ve internalizasyonu ile ilişkilidir (Summers ve ark., 1997). β_1 - ve β_2 -AR'lerin C terminal bölgesinde bulunan serin ve treonin rezidüleri G-proteini ile kenetli reseptör kinazların (GRK) substratı ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı protein kinaz (pKA) için bağlanma bölgeleri olarak görev yapar. β_3 -AR'lerin ise pKA fosforilasyon bölgeleri yoktur ve C-terminalinde daha az miktarda serin ve treonin rezidüsü içerirler. β_3 -AR'lerin bu nedenlerle kısa süreli agonist aracılı desensitizasyona rezistan olduğu gösterilmiştir (Rozec ve Gauthier, 2006). Benzer şekilde β_3 -AR'lerin sürekli uyarılması, β_1 - ve β_2 -AR'lerden farklı olarak, fonksiyonel etkilerini ya da β_3 -AR bağlanma bölgesi sayısını değiştirmemektedir (Rouget ve ark., 2004). Bu veriler sempatik sinir sisteminin sürekli aktivasyonu sonrası β_1 - ve β_2 -AR aracılı yanıtların azalmasına karşın β_3 -AR

aracılı yanıtların neden korunduğunu açıklayabilecek niteliktedir (Rozec ve Gauthier, 2006).

1.3.2. β_3 - Adrenoseptörler Farmakolojisi

β_3 -AR'ler farmakolojik olarak bazı ölçütlerle tanımlanmaktadır:

- 1) BRL 37344, CL 316243 ve SR 58611A gibi selektif agonistlere karşı yüksek afinite ve potens göstermelidirler (Arch&Kaumann, 1993; Emorine ve ark., 1994; Strosberg&Pietri-Rouxel,1996);
- 2) CGP 12177A (Liggett, 1992; Kaumann ve Molenaar, 1996), busindolol (Liggett ve ark., 1993) ve pindolol (Blin ve ark., 1993) gibi çeşitli β_1 -AR ve/ya da β_2 -AR antagonistlerinin parsiyel agonistik etkilerine aracılık etmelidirler;
- 3) Propranolol ve nadolol gibi konvensiyonel β -AR antagonistlerine atipik olarak düşük afinite göstermelidirler (Rozec ve Gauthier, 2006);
- 4) SR 59230A gibi selektif β_3 -AR antagonistleri ve bupranolol gibi β_1 -, β_2 -, β_3 -antagonistleri ile bloke edilmelidirler (Gauthier ve ark., 2000).

1.3.2.1. Agonistler

β_3 -ARler, β_1 - ve β_2 -AR'lere göre daha yüksek katekolamin konsantrasyonlarında aktive olurlar (Strosberg, 1997). Bu da katekolaminlerin ancak çok yüksek konsantrasyonlarda β_3 -AR-aracılı etkiler oluşturabildiğini göstermektedir. β_3 -AR'ler iki farklı sınıftan selektif agonistlerle aktive olurlar. İlk sınıf BRL 37344 (Arch ve ark., 1984), SR 58611A (Bianchetti ve Manara, 1990) ve CL 316243 (Dolan ve ark., 1994) gibi feniletanolaminleri kapsar. Bu bileşiklerden BRL 37344 ve SR 58611A β_1 - ve β_2 -AR'lere karşı da düşük afinite gösterirler. İkinci sınıf ise ariloksiproporanolaminleri kapsar. Bu bileşikler arasında CGP 12177A (Pietri-Rouxel & Strousberg, 1995; Lenzen ve ark., 1998) ve siyanopindolol sayılabilir. CGP 12177A, β_1 - ve β_2 -AR antagonisti etkinlik de gösterir.

1.3.2.2. Antagonistler

β_3 -AR'lerin bupranolol gibi nonselektif β -AR antagonistleri tarafından bloke edildikleri gösterilmiştir (Langin ve ark., 1991; Galitzky ve ark., 1993). Ayrıca selektif β_3 -AR antagonisti SR 59230A tarafından da bloke edilirler. Bu bileşik rodentlerde selektif β_3 -antagonisti olarak etkinlik gösterir (Kaumann ve Molenaar, 1996; Manara ve ark., 1996; Kubo ve ark., 1997), ne var ki, insan β_3 -AR'leri için selektif antagonistler olarak L-748.328 ve L-748.337 bileşikleri kullanılmaktadır. Ancak bu bileşiklerin de rodent β_3 -AR'lerine karşı düşük afiniteli oldukları gösterilmiştir (Candelore ve ark., 1999).

1.3.3. Kalpteki β_3 -Adrenoseptörler

Myokardiyal fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynayan β -AR'lerden pozitif inotropik ve kronotropik etkiler oluşturan β_1 - ve β_2 -AR'lerin tersine β_3 -AR'lerin uyarılmaları sonucunda kardiyovasküler sistemde negatif inotropi oluşur. İnsan ve öteki bazı hayvan türlerinin kalplerinde varlığı belirlenen β_3 -AR'ler gerçekten de kalp kontraktilitesinde belirgin bir azalmaya yol açarlar (Gauthier ve ark., 2000).

1.3.3.1. Kontraktil Etkileri

β_3 -AR'lerin tanımlanması ilk olarak transplante kalplerden alınan insan endomyokardiyal biyopsilerinde yapılmıştır. Bu dokularda β_1 - ve β_2 -AR antagonisti olan ve aynı zamanda β_3 -AR'lere de düşük oranda afinite gösteren nadolol varlığında (Emorine ve ark., 1989; Galitzky ve ark., 1993), isoprenalinin oluşturduğu pozitif inotropik etkinin, negatif inotropik etkiye dönüştüğü gözlenmiştir (Gauthier ve ark., 1996). Benzer şekilde, α_1 -, β_1 -, β_2 -AR antagonisti varlığında endojen bir katekolamin olan noradrenalinin de kardiyodepresan etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (Gauthier ve ark., 1998). Potens sıralamasına göre BRL 37344, SR 58611A ve CL 316 243 gibi çeşitli β_3 -AR agonistleri ile de negatif inotropik etki elde edilmiştir (Gauthier ve ark., 1996). Başka bir çalışmada β_3 -AR agonistlerin

kardiyodepresan etkilerinin metoprolol (β_1 -AR antagonisti) ya da nadololden (β_1 - ve β_2 -AR antagonisti) etkilenmediği, bupranolol (β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR antagonisti) (Langin ve ark., 1991; Galitzky ve ark., 1993) ile antagonize olduğu saptanmıştır (Gauthier ve ark., 1996). β_3 -AR'lerin varlığı sağlıklı insan ventrikülünde PCR (Gauthier ve ark., 1996), Western Blot ve immunohistokimyasal deneyler ile de kanıtlanmıştır (Moniette ve ark., 2001). Buna karşın insan atrium ve ventriküllerinde BRL 37344 gibi β_3 -AR agonistlerinin kardiyodepresan etki göstermediğini bulan çalışmalar da bulunmaktadır (Kaumann ve Molenaar, 1997; Molenaar ve ark., 1997). Ayrıca insan atriumunda parsiyel β_3 -AR ve düşük afiniteli β_1 -AR agonisti olan pindolol pozitif inotropik etki oluşturmuş ve bu etki β_3 -AR selektif antagonisti L-748,337 ile bloke edilememiştir (Joseph ve ark., 2003). Bu da etkinin β_3 -AR'ler üzerinden olmadığını düşündürmüştür. Ancak, insan β_3 -AR'üne karşı oluşturulan selektif monoklonal antikör (Mab 72c) ile yapılan bir çalışmada insan atrium dokusunda β_3 -AR'lerin bulunduğu gösterilmiştir (Chamberlain ve ark., 1999). Başka bir çalışmada ise BRL 37344'ün insan sağ atrium trabekülünde pozitif inotropik etki yaptığı ve bu etkinin nadolol varlığında kaybolduğu gösterilmiştir (Pott ve ark., 2003). Bu etkinin nadolol varlığında kaybolması BRL 37344'ün insan atriumlarında β_1 - ve β_2 -AR'leri etkilediğini göstermektedir (Pott ve ark., 2003). Bir başka anlatımla, BRL 37344 atriumlarda, ventriküllerden farklı olarak negatif inotropik etki oluşturmamaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkarak insan atriumunda β_3 -AR'lerin varlığı ve fonksiyonlarının aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim bulunmaktadır (Rozec ve Gauthier, 2006).

β_3 -AR agonistlerinin oluşturduğu kardiyak etkiler türler arasında farklılık gösterir. Bu agonistlerin insan myokardındaki farmakolojik profilleri hayvan modellerindeki profillerinden çoğu kez farklıdır. Buna ek olarak, kullanılan yöntemler de sonuçları etkilemektedir (Rozec ve Gauthier, 2006). Örneğin, kobay izole atriumunda SR 58611A (Bianchetti ve Manara, 1990) ve CL 316243 (Dolan ve ark., 1994) kontraktile ve kalp atım hızını etkilemediği, buna karşın Langendorff-perfüze kobay kalbinde β_3 -AR stimülasyonunun negatif inotropik etkiye neden olduğu gösterilmiştir. (Kitamura ve ark., 2000).

Köpeklerde intravenöz yoldan uygulanan β_3 -AR agonistlerinin pozitif kronotropik etki oluşturduğu belirlenmiştir (Tavernier ve ark., 1992). Bu etkinin gözlemlendiği deney hayvanlarının denerve edilmediği, bu nedenle, taşikardinin β_3 -AR agonistlerinin oluşturduğu vazodilatasyon sonucu düşen kan basıncına yanıt olarak gelişen

baroreseptör refleks mekanizması aracılığıyla oluştuğu düşünülmektedir (Berlan ve ark., 1994; Shen ve ark., 1994, 1996). Ne var ki, daha sonra yapılan bir çalışmada otonomik blok uygulanan köpeklerde CL 316243'ün pozitif inotropik etki oluşturmaya devam ettiği ama kalp atım hızı üzerine olan etkilerinin kaybolduğu saptanmıştır (Shen ve ark., 1996). BRL 37344 injekte edilen bir köpeğin kanıyla perfüze edilen izole köpek atriumunda da pozitif kronotropik ve inotropik etkiler oluştuğu gösterilmiştir. Bu etkiler β_1 -AR stimülasyonu ile açıklanmış ve baroreseptör aktivasyonu ya da kan alınan köpektaki katekolamin salınımı nedeniyle olabileceği düşünülmüştür (Takayama ve ark., 1993). Köpek papiller kasında, birçok β_3 -AR agonisti insanda gözlenenden daha düşük boyutta negatif inotropik etki oluşturur (maksimum negatif inotropik etki sırasıyla %50 ve %30). Köpeklerde β_3 -AR agonistlerinin etki gücü sıralaması da insanlardakinden oldukça farklıdır (CGP 12177A > BRL 37344 $\approx$ SR 58611A >> CL 316243) (Gauthier ve ark., 1999). Oysa bu sıralama insanlarda BRL 37344 > SR 58611A $\approx$ CL 316243 >> CGP 12177A şeklindedir (Gauthier ve ark., 1996). Köpek myositlerinde BRL 37344 kasılma ve gevşemelerde konsantrasyon-bağımlı azalmalara neden olmaktadır. Bu etki β_1 - ve β_1 -/ β_2 -AR antagonistleri ile değiştirilememekte, ancak, β_3 -AR antagonistleri bupranolol, L-748,337 ile tümüyle ortadan kalkmaktadır (Rozec ve Gauthier, 2006). Bu da BRL 37344'ün negatif inotropik etkisinin β_3 -AR'ler aracılı olduğunu göstermektedir. Bu bulgu daha sonra köpeklerde β_3 -AR transkript ve proteinlerinin de gösterilmesi ile desteklenmiştir (Cheng ve ark., 2001).

Rat atriumunda, β_3 -AR agonistleri (CL 316243, ZD 2079 ve SR 58611A) nanomolar konsantrasyonlarda bile kolon düz kaslarında gevşeme oluşturmalarına karşın (Kauman and Molenaar, 1996; Cohen ve ark., 1999) mikromolar konsantrasyonlarda kronotropi ve inotropiyi etkilememektedir. Rat ventriküllerinde ise BRL 37344'ün küçük bir yanıt oluşturduğu belirlenmiştir (Gauthier ve ark., 1999). Sözü edilen bulgu rat myokardında β_3 -AR ekspresyonunun çok düşük olduğunun anlaşılmasıyla desteklenmiştir (Gauthier ve ark., 1999). Dinçer ve arkadaşları (2001) da rat kalbinde β_3 -AR transkripti ve proteinini saptamışlardır.

Kontrol farelerde (wild-type), β_3 -AR agonistleriyle kontraktilitede anlamlı olmayan yanıtlar gözlenmiş ve bu dokuda β_3 -AR proteinleri saptanamamıştır (Tavernier ve ark. 2003). Bununla birlikte insan β_3 -AR'lerinin overeksprese edildiği farelerde β_3 -AR stimülasyonu sonucu insan ventriküler dokularında elde edilen etkiye benzer şekilde negatif inotropik etki gözlenmiştir (Tavernier ve ark., 2003). Bunun tersine, *in vivo*

olarak benzer bir modelde yapılan bir başka çalışmada ise β_3 -AR agonisti L-755,507 pozitif inotropik yanıt oluşturmıştır (Kohout ve ark., 2001). *Ex vivo* ve *in vivo* gibi farklı deneysel yöntemlerin kullanılması, farelerin genetik zeminlerinin (B6D2/F1 ya da B6S/F1 hibridi) farklı olması sonuçlardaki farklılığı kısmen açıklamaktadır. Dahası kullanılan β_3 -AR agonistlerin yapı ve konsantrasyonlarının farklı olması da sonuçları etkilemektedir (Rozec ve Gauthier, 2006).

1.3.3.2. Elektrofizyolojik Etkileri

Kardiyak kontraktilitede β_3 -AR aracılı azalmanın mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte transmembran iyon kanalları aktivitesindeki ve eksitasyon-kontraksiyon kenetindeki değişikliklerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Rozec ve Gauthier, 2006). β_3 -AR'lerin kardiyak elektrofizyolojik etkileri henüz çok fazla aydınlatılamamıştır. Köpek ve rat kardiyomyositlerinde ve spontan atan kobay kalbinde, BRL 37344'ün negatif inotropik etkisi L-tipi kalsiyum kanallarının inhibisyonu ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarındaki azalmayla ilişkilidir (Kitamura ve ark., 2000; Cheng ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2005b). İnsan endomyokardiyal biyopsilerinde β_3 -AR agonistleri ventriküler mekanik yanıtları değiştirdikleri konsantrasyonlarda, ventriküler aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazında bir hızlanma ve amplitüdde bir azalma oluşturmaktadır (Gauthier ve ark., 1996). Bu bulgular kistik fibrozis transmembran regülatörü geninde (CFTR) mutasyon (Riordan ve ark., 1989) nedeniyle oluşan bir hastalık olan kistik fibrozisli hastalardan elde edilen ventriküler dokularda gözlenmemiştir (Leblais ve ark., 1999). CFTR geni insan kalbinde eksprese edilen bir gendir (Levesque ve ark., 1992; Warth ve ark., 1996). Kistik fibrozisi olan ve olmayan hastaların ventriküler dokularından elde edilen β_3 -AR agonistlerinin oluşturduğu yanıtlar arasındaki uyumsuzluğun, kistik fibrozisli kalp kasında fonksiyonel olmayan CFTR kanalları yoluyla repolarize edici klorür akımının aktive olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (Rozec ve Gauthier, 2006). β_3 -AR'ler ve CFTR'in birlikte eksprese edildikleri sistemlerde, β_3 -AR agonistleri CFTR'i cAMP-PKA bağımsız bir yolak üzerinden aktive ederler (Leblais ve ark., 1999). β_3 -AR stimülasyonu ile oluşan aksiyon potansiyelinin repolarizasyonu potasyum kanalları üzerine olan etkilerden de kaynaklanabilir. Ancak, β_3 -AR stimülasyonunun potasyum kanalları üzerindeki

etkilerine ilişkin çelişkili bilgiler bulunmaktadır (Rozec ve Gauthier, 2006). Rekombinant bir sistemde, β_3 -AR'lerin KvLQT1/MinK potasyum kanallarını aktive ettikleri öne sürülmüştür (Kathofer ve ark., 2000). Ancak bu çalışmada selektif β_3 -AR agonistleri kullanılmamıştır. Kobay kardiyomyositlerinde BRL 37344 I_{Ks} potasyum kanallarını inhibe ederek aksiyon potansiyel süresinin uzamasına yol açmıştır (Bosch ve ark., 2002). β_3 -AR'lerin kardiyak repolarizasyonun düzenlenmesindeki rolünün aydınlatılması için daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim bulunmaktadır (Rozec ve Gauthier, 2006).

β_3 -AR stimülasyonunun kalp atım hızı üzerine olan etkisini incelemek için BRL 37344 ve CL 316243 gibi β_3 -AR agonistleri kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalarda köpek ve ratlarda pozitif kronotropik etkiler gözlenmiştir (Tavernier ve ark., 1992; Shen ve ark., 1994, 1996). Ancak, bu etkilerin sinoatrial düğümü denerve edilmiş köpeklerde (Tavernier ve ark., 1992) ve β_1 -/ β_2 -AR blokeri verilmiş köpek ve ratlarda (Shen ve ark., 1996) ortadan kalkması, yanıtların doğrudan kardiyak β_3 -AR stimülasyonunun bir sonucu değil de refleks mekanizmalardan kaynaklandığını göstermektedir. İnsanlarda yapılan benzer çalışmalarda, β_3 -AR stimülasyonu sonucu gözlenen pozitif kronotropik yanıtların da β_1 - ve β_2 -AR antagonistleriyle ortadan kalkması (Wheeldon ve ark., 1993, 1994), etkinin β_3 -AR aracılığıyla gelişen vazodilatasyona barorefleks yanıt olarak gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. TG β_3 türü ratlarda kalp atım hızının arttığı bulunmuştur (Tavernier ve ark., 2003). Başka bir çalışmada ise kontrol ve TG β_3 türü ratlar arasında benzer kalp atım hızı olduğu bulunmuştur (Kohout ve ark., 2001). Sonuç olarak, kalp atım sayısındaki artışın, fare iletim sisteminde bulunan KvLQT1 potasyum kanallarının (Wang ve ark., 1996) aktivasyonundan ya da overekspresyon sonucu aktif β_3 -AR ekspresyonundaki artıştan kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Milano ve ark., 1994). Ne var ki, I_{Ks} potasyum kanalları yetişkin fare kalbinde bulunmamaktadır (Kupersmidt ve ark., 1999). Bu nedenle yetişkin farelerde kalp atım hızında gözlenen değişikliklerden potasyum kanallarının sorumlu olması olanaklı değildir. Bu bulgulara dayanarak β_3 -AR'lerin kalp atım hızını düzenleyici etkilerine ilişkin mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir (Rozec ve Gauthier, 2006).

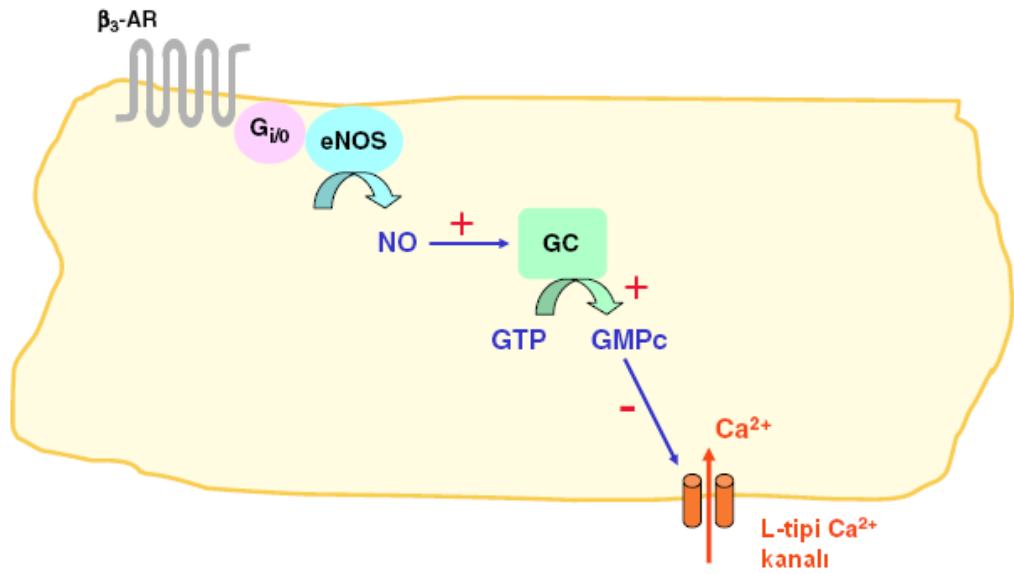
1.3.3.3. Sinyal Yolakları

Kalpde β_3 -AR'ler, β_1 - ve β_2 -AR'lerin tersine G_s proteinine değil G_i proteine kenetlidir. Bu durum insan ventriküler dokusunun pertussis toksin inkübasyonu sonrasında köpek ve rat myositlerinde β_3 -AR stimülasyonu ile gözlenen negatif inotropinin ortadan kalkmasıyla kanıtlanmıştır (Gauthier ve ark., 1999; Cheng ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2005b). Rodent adipositlerinde β_3 -AR'ler hem G_i hem de G_s proteinlerine kenetli olabilirler (Chaundry ve ark., 1994; Begin-Heick, 1995). Bir çalışmada rekombinant bir sistemde farelerde β_{3b} -AR izoformunun hem G_s hem de G_i proteinine kenetli olduğu, β_{3a} -AR izoformunun ise yalnızca G_i proteini ile kenetli olduğu gösterilmiştir (Hutchinson ve ark., 2002). Buna karşın henüz günümüzde bu iki izoformun kalpte varlığını ya da fonksiyonlarını gösteren bir çalışma bulunmamaktadır (Rozec ve Gauthier, 2006).

İnsan ventriküllerinde G_i proteininin aktivasyonu adenilat siklaza inhibisyonuna yol açmamakta ancak hem endotelial hücrelerde hem de ventriküler kardiyomyositlerde endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) üzerinden (Gauthier ve ark., 1998) nitrik oksid yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır (Schulz ve ark., 2006). β_3 -AR geni çıkarılmış farelerde izoprenalin ile sağlanan kardiyak kontraktile yanıtı kontrollerle karşılaştırıldığında artmaktadır. Bu yanıtlar L-NMMA (NG-monometil-L-arginin monoasetat) ile NOS inhibisyonu yapıldığında β_3 -AR'leri çıkarılmış farelerde değişmemekte, ne var ki, kontrollerde artmaktadır (Varghese ve ark., 2000). β_3 -AR transkript ve proteinlerinin fare kalbinde bulunmaması gözlenen bu etkinin damarlardaki β_3 -AR varlığından kaynaklandığını düşündürmektedir. Buna ek olarak, bu çalışmanın sonuçları kalpte katekolaminlerin pozitif inotropik etkilerine karşı β_3 -AR/NO yolağının bir negatif "feedback" mekanizması olarak etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Rozec ve Gauthier, 2006).

Nitrik oksid üretiminin artması guanilat siklazı aktive ederek hücre içinde siklik guanozin monofosfat (cGMP) konsantrasyonlarının artmasına neden olmaktadır (Gauthier ve ark., 1998). Rat ve köpek myositlerinde yapılan çalışmalarda da bu yolağın etkisine ilişkin benzer sonuçlar elde edilmiştir (Cheng ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2005b). cGMP düzeylerinin artması, doğal olarak, farklı hedefleri aktive edebilir. Bunlardan ilki L-tipi kalsiyum kanallarının regülasyonu ile kalsiyum akımını azaltan (Mery ve ark., 1991; Wahler ve Dollinger, 1995) ya da kalsiyum geçişlerindeki değişikliklerden bağımsız olarak myofilament proteinlerinin kontraktil

yanıtlarını azaltan (Shah ve ark., 1994; Goldhaber ve ark., 1996; Yasuda ve Lew, 1997) cGMP-bağımlı protein kinazlardır. İkincisi ise cAMP düzeylerini azaltan (Mery ve ark., 1991) fosfodiesterazlardır (PDEII; Beavo, 1995). Bunlara ek olarak, NO'nun cGMP'den bağımsız bir şekilde sitokrom c oksidaz (Torres ve ark., 1995), kreatin fosfokinaz (Gross ve ark., 1996) gibi anahtar proteinlerin ya da L tipi Ca^{2+} kanallarının (Campbell ve ark., 1996) kovalent modifikasyonları ile fonksiyonu düzenlediği de düşünülebilir (Rozec ve Gauthier, 2006) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Kardiyomyositlerdeki β_3 -AR sinyal yolağı. β_3 -AR: β_3 -Adrenoseptör; Ca^{2+} : Kalsiyum; cGMP: siklik guanozin mono fosfat; eNOS: endotelial nitrik oksid sentaz; $G_{i/o}$: $G_{i/o}$ proteini; GTP: guanozin trifosfat; GC: guanil siklaz; NO: Nitrik oksid; +: stimülasyon; -: inhibisyon (Gauthier ve ark., 2000)

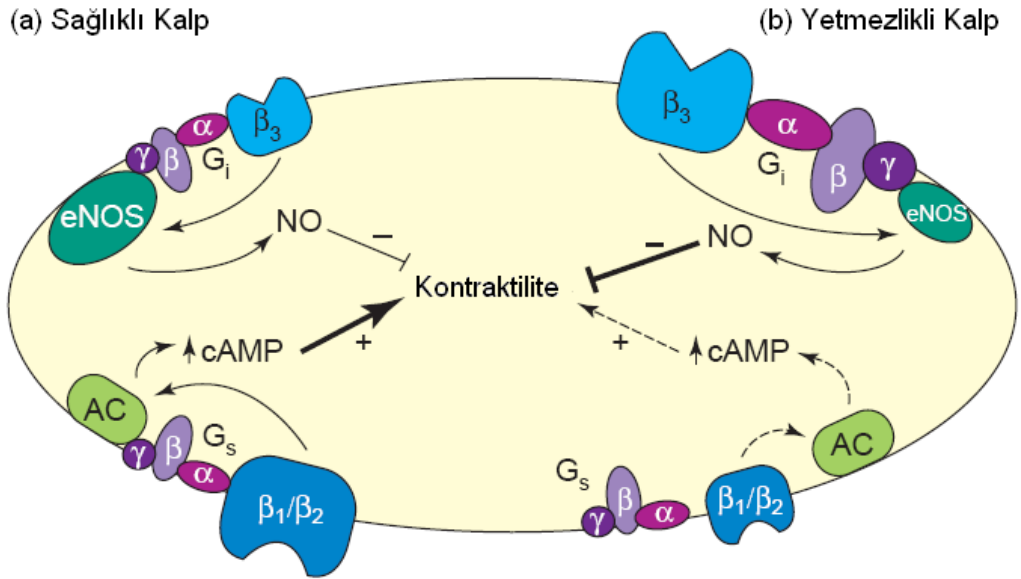
İnsan atrium trabeküllerinde BRL 37344'ün kontraktıl yanıtları β_3 -AR'ler üzerinden etkilemediği, ancak, doğrudan eNOS aktivitesini stimüle ederek NO yapımını arttırdığı saptanmıştır (Pott ve ark., 2003). Bu bulgu, insan atriumundaki β_3 -AR stimülasyonunun ventrikül myokardındaki β_3 -AR stimülasyonu ile aynı fonksiyonel öneme sahip olmadığını düşündürmektedir. Bunun olası nedenleri arasında; (i) insan atria ve ventriküllerindeki kenetlenmenin farklı olması, (ii) sağ atriumdaki β_3 -AR ekspresyonunun sol ventriküldekinden daha düşük olması, (iii) eNOS'un atriumda overeksprese olması (Bloch ve ark., 1999) sayılabilir (Rozec ve Gauthier, 2006).

Atrial β_3 -AR sisteminin aşırı β_1 - ve β_2 -AR stimülasyonu sonucu oluşabilecek aritmi ya da sinüs taşikardisine karşı koruyucu bir negatif “feedback” mekanizma olabileceği düşünülmektedir (Rozec ve Gauthier, 2006). Ne var ki, bu hipotez Tavernier ve arkadaşlarının (2003) β_3 -AR overeksprese edilmiş transgenik farelerde gösterdiği β_3 -AR stimülasyonu ile gözlenen kalp atımındaki artış ile çelişmektedir (Rozec ve Gauthier, 2006). Bu çelişki, çalışılan sağ atrium dokularının kapak ya da koroner kalp hastalığı olan bireylerden alınmış olması ve β_3 -AR yanıtlarının bu hastalık durumundan ya da kullanılan ilaçlardan etkilenmiş olması ile açıklanabilir. Bu nedenle de atrial β_3 -AR’lerin fonksiyonu ile ilgili daha fazla çalışma gerekmektedir (Rozec ve Gauthier, 2006).

1.3.3.4. Kardiyovasküler Patolojilerdeki Yeri

1.3.3.4.1. Kalp Yetmezliği

Kalp yetmezliği hastalarında sempatik sinir sisteminin aşırı aktivasyonu söz konusudur. Yüksek katekolamin düzeyleri kısa dönemde kontraktilite ve kalp atım hızını arttırarak kardiyak performansın sürdürülmesini sağlamaktadır. Ne var ki, başlangıçta yararlı olan kardiyak adrenerjik aktivitedeki artış daha sonra myokarda zarar vermektedir (Gauthier ve ark., 2007). Tüm deneysel kalp yetmezliği modellerinde β_3 -AR ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Moniette ve ark., 2001; Morimoto ve ark., 2004). Ancak fonksiyonel yanıtlarda oluşan değişiklikler β_3 -AR sayısı ile paralellik göstermemektedir. Yetmezlikli insan kalbinde BRL 37344 ile oluşan negatif inotropik etkinin reseptör ekspresyonundaki artışa karşın azaldığı bulunmuştur (Moniette ve ark., 2001). Deneysel modellerde ise kalp yetmezliğinde gözlenen β_3 -AR sayısındaki artışın β_3 -AR stimülasyonu ile oluşan negatif inotropik etkideki artış ile örtüştüğü gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2001; Morimoto ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2005b). Bu değişiklikler, türler arasındaki farklılık, kalp yetmezliğinin derecesi ya da insanlarda kalp yetmezliği tedavisi için kullanılan ilaçların etkisinin bir sonucu olabilir (Rozec ve Gauthier, 2006).



Şekil 1.6. Sağlıklı ve yetmezlikli kalp kasında inotropik olarak zıt etki gösteren β -AR'lerin hipotetik rolü. NO, nitrik oksid, AC, adenilat siklaz, eNOS, endotelial nitrik oksid sentaz. (Gauthier ve ark., 2000)

Kalp yetmezliğinde aşırı sempatik sinir sistemi aktivasyonu sonucu β_1 -AR ekspresyonu azalmakta ve β_2 -AR'lerde ise desensitizasyon gelişmektedir. Bu değişiklikler β_1 -/ β_2 -AR-aracılı pozitif inotropik yanıtların azalmasıyla sonuçlanmaktadır. Öte yandan, yetmezlikte β_3 -AR ekspresyonunun artması, bu reseptör alttipinin aracılık ettiği negatif inotropik yanıtların göreceli olarak artmasını sağlamaktadır (Moniotte ve Balligand, 2002; Germack ve Dickenson, 2006). Yetmezlik durumunda sol ventrikülde β_1 - ve β_3 -AR düzeylerinde gözlenen zıt değişimlerin insanlarda kalp yetmezliğindeki fonksiyonel bozukluklara katkısı şekil 1.6'da gösterilmiştir. Yetmezliğin başlangıcında β_3 -AR'lerde oluşan upregülasyonun kardiyomyosit hasarını önlemeye yönelik koruyucu bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, β_3 -AR'leri overeksprese edilmiş farelerde histolojik olarak myosit hipertrofisi ya da fibrojeniz gözlenmemesi, β_3 -AR aktivasyonunun kalp yetmezliğini yol açtığı kardiyomyosit hasarında rolü olmadığını düşündürmektedir (Tavernier ve ark., 2003). Kalbin β_3 -AR stimülasyonu ile korunması; (i) L tipi Ca^{++} kanallarının aktivasyonunda azalma ve bunun sonucunda kalsiyum "overload"unda azalma, (ii) NO yapımının artması ile daha iyi bir diastolik fonksiyonun sağlanması, (iii) negatif inotropik etki sonucu hücre içi ATP ve kreatin fosfat içeriğinin korunması, (iv) arter ve venlerde oluşan vazodilatör etki sonucu

preload ve afterload'un azalmasına bağılı olarak vazodilatasyon gelişmesi ve oksijen sunumu/tüketimi oranında düzelme gibi mekanizmaların bir sonucu olarak ortaya çıkabilir (Rozec ve Gauthier, 2006). Sağlıklı bir kalpte, β_3 -AR stimülasyonu ile oluşan negatif inotropik etki stres, fiziksel efor gibi yoğun adrenerjik uyarımın olduğu durumlarda kalbi koruyucu (safety valve) görev yapmaktadır. Ancak kalp yetmezliği ilerledikçe β_3 -AR'lerin sürekli uyarılması myokardiyal depresyonu arttırmaktadır. Yetmezlikli rat kalbinde, β_3 -AR agonistlerinin kardiyak fonksiyonları kötüleştirdiği ve kardiyak myosit apoptozisini stimüle ettiği gösterilmiştir (Kong ve ark., 2004).

Son yıllarda damarlardaki β_3 -AR'leri uyararak vazodilatör etkinlik de gösteren nebivolol ve busindolol gibi β -blokerler (Toda,2003) klinikte antihipertansif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sözü edilen β -blokerler β_3 -AR'ler üzerindeki etkileri nedeniyle endotel hücrelerinden NO salgılanmasını arttırırlar. Buna ek olarak, nebivolol'un insan ventriküllerinde NO-aracılı negatif inotropik etki oluşturduğu da gösterilmiştir. Bu nedenle, vazodilatör etkili β -blokerlerin oksijen radikallerini süpürerek apoptozis, nekrozis ve/veya myokard hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabileceği düşünülmüştür. Bu noktadan yola çıkarak, kalp yetmezliği tedavisinde vazodilatör etkili 3.kuşak β -blokerlerin klasik β -blokerlere oranla daha yararlı olabileceği öngörülmüştür. Gerçekten de sol ventrikül disfonksiyonlu hastalarda yapılan bir çalışmada nebivolol kullanımının diastolik fonksiyon ve egzersiz kapasitesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu anlaşılmıştır (Nodari ve ark., 2003; Matter ve ark., 1999). Ne var ki, bir başka çalışmada busindololun ilerlemiş kronik kalp yetmezlikli hastalarda hiçbir yararlı etkisinin olmadığı da bildirilmiştir (Beta-Blocker Evaluation of Survival Trail Investigators, 2001). Sonuç olarak, β_3 -AR'lerin kalp yetmezliğinin erken ve geç dönemlerinde oynadıkları rolün ve nebivolol, busindolol gibi β_3 -AR agonistik özelliği olan β -blokerlerin kalp yetmezliği tedavisindeki potansiyel öneminin aydınlatılabilmesi için uygun modeller kullanılarak *in vitro*, *in vivo* ve *ex vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir (Rozec ve Gauthier, 2006).

1.3.3.4.2. Hipertansiyon

Hipertansiyon, kısmen pre- ya da post-sinaptik sempatik disfonksiyona bağılı olarak vazokonstriktör ve vazodilatör mekanizmalar arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır (De Champlain, 2001). Sistemik hipertansiyonda insan (Michel ve ark., 1990) ve hayvan (Feldman, 1987; Michel ve ark., 1990; Dogrell ve Surman, 1995) deneylerinde β -adrenoseptör yanıtlarında genel bir azalma gözlenmiştir. Esas bozukluklar β -AR downregülasyonu, G protein düzeylerindeki değişiklikler ve β -AR-G proteini kenetlenmesindeki bozukluklardır (Werstiuk ve Lee, 2000). Hipertansiyonda vasküler β_3 -AR'lerin rolünü inceleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Köpek perinefritik hipertansiyon modelinde yapılan bir çalışmada β_3 -AR stimülasyonunun yararlı olduğu gösterilmiştir (Donckier ve ark., 2001). 12 haftalık spontan hipertansif ratlarda yapılan bir başka çalışmada β_3 -AR ekspresyonunun arttığı, ne var ki, bu artışa β_3 -AR-aracılı vazodilatasyonda bir artışın eşlik etmediği gösterilmiştir (Mallem ve ark., 2004). β_3 -AR ekspresyonundaki artışın, kısmen β_1 - ve β_2 -AR ekspresyonundaki azalmanın dengelenmesine yönelik refleks bir mekanizma olduğunu düşünmek mantıksal görünmektedir. β_3 -AR'lerin hipertansiyon patogeneziindeki rolünü açıklamak için ek çalışmalara gereksinim vardır (Gauthier ve ark., 2007).

1.3.3.4.3. Koroner Arter Hastalığı

İnsanlarda β_3 -AR'lerin mikrokoroner arterlerdeki yerleşimi koroner arter hastalıklarında potansiyel bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Dessy ve ark., 2004). Dahası, nebivolol β_3 -AR agonistik özelliğine bağılı olarak anjiyogenik yanıtlar oluşturmaktadır (Dessy ve ark., 2005). Bu nedenle, iskemik kardiyak ya da periferik damar hastalıklarında ek kardiyovasküler yararlar da sağlamaktadır. Ne var ki, iskemi ve reperfüzyonda β_3 -AR stimülasyonunun yararlı mı yoksa zararlı mı olacağı henüz belirlenememiştir. Ancak, β_3 -AR stimülasyonu negatif inotropik etkiye aracılık ettiği için, en azından kuramsal olarak, kalbi aşırı oksijen tüketiminden koruyabileceği ve böylece kardiyoprotektif etki gösterebileceği düşünülebilir (Rozec ve Gauthier, 2006).

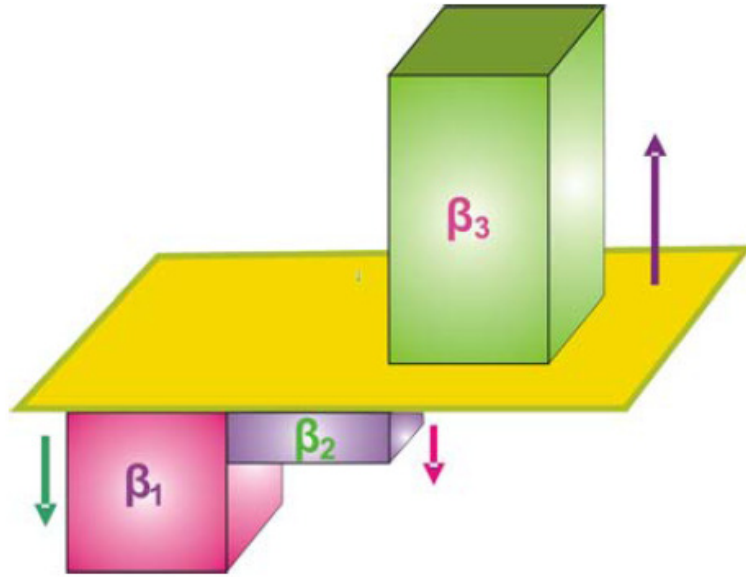
Koroner arter bypass sonrası damarların aşırı endojen katekolaminlere maruz kalması nedeniyle vasküler β -AR yanıtları belirgin olarak bozulmaktadır (Friedman ve ark., 1995, Sellke ve ark., 1997). Sözü edilen disfonksiyon çeşitli mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır: (1) β -AR'lerin G_s -protein-adenilat siklaz kompleksinden ayrılması ve (2) kompleksin adenilat siklaz ögesindeki bozukluk (Schranz ve ark., 1993, Booth ve ark., 1998). β_1 -/ β_2 -AR'lerin tersine, β_3 -AR'ler yalnızca çok yüksek katekolamin düzeylerinde aktive olmaktadır (Pietri-Rouxel ve Strosberg, 1995). Buna ek olarak, β_3 -AR'ler densensitazasyona karşı da dirençlidirler (Iwase ve ark., 2000). β_3 -AR stimülasyonu koroner arter bypass'ından sonra koroner akışı artırır ve β_3 -AR agonistlerinin oluşturduğu negatif inotropik etki myokardiyal oksijen tüketimini azaltabilir (Gauthier ve ark., 1996).

β -blokerlerin rutin kullanımı akut myokard infarktüsü sonrasında revaskülarizasyon ameliyatı geçirmiş hastalarda mortaliteyi azalmaktadır (Chen ve ark., 2000). Çoğu hastanın koroner arter bypass cerrahisi sonrası asemptomatik olmasına karşın bypassda kullanılan internal mammarian arter greftlerinde kan akımının maksimal egzersiz için yetersiz olduğu gösterilmiştir (Kawasuji ve ark., 1993). Bu noktadan yola çıkarak, araştırmalar nebivolol ve busindolol gibi β_3 -AR agonistik etkilerinden kaynaklanan vazodilatör özelliği de bulunan üçüncü kuşak β -blokerler üzerinde yoğunlaştırılmaktadır (De Groot ve ark., 2003; Toda, 2003; Rozec ve ark., 2009).

1.3.3.4.4. Diabetes Mellitus

Diabet, mikroanjiyopati ve atereoskleroz gibi vasküler komplikasyonlarla ilişkili bir hastalıktır. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda diabette endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının azaldığı gösterilmiştir (Johnstone ve ark., 1993; Turner ve White, 1996). Ayrıca diabetik ratlarda β -AR stimülasyonunun diastolik kan basıncı üzerindeki etkilerinin tümüyle bozulduğu da gözlenmiştir (Gallego ve ark., 2002). Diabetik kalplerde β -AR agonist stimülasyonu ile alınan kronotropik ve inotropik yanıtlar azalmaktadır (Yu ve McNeill, 1991). 14 haftalık diabetik ratlarda kardiyak β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR protein düzeylerinin oranı kontrol ratlarda 62:30:8; diabetik ratlarda ise 40:36:23 olarak bulunmuştur (Dincer ve ark., 2001). Bu bulgular kronik diabette gözlenen kardiyak disfonksiyonu en azından kısmen açıklamaktadır.

β_3 -AR'lerin moleküler varyasyonları obezite, insülin rezistansı ve tip 2 diabete yol açabilmektedir. Trp64Arg polimorfizminin erken tip 2 diabet oluşumu (Walston ve ark., 1995) ve Japon tip 2 diabetik hastalarda diabetik retinopati ve nefropatiyle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Sakane ve ark., 1997,1998). Öte yandan, β_3 -AR gen polimorfizminin tip 2 diabetiklerde proliferatif retinopati için bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Sakane ve ark., 1997). Kısa süre önce yapılan bir çalışmada homozigot β_3 -AR genindeki Trp64Arg mutasyonunun diabetle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Xiu ve ark., 2004). Bu sonuçlar, β_3 -AR'lerin diabet nedeniyle oluşan kardiyak komplikasyonların gelişiminde bir şekilde rol oynadıklarını göstermektedir. Ne var ki, diabette henüz fonksiyonel bir çalışma gerçekleştirilmemiş olduğundan β_3 -AR ekspresyonundaki artışın negatif inotropik etkiye yansıyor yansımadığı bilinmemektedir. Ancak, diabette β_1 -AR ekspresyonunun azalması buna karşın β_3 -AR ekspresyonunun artmasının diabetin yol açtığı kardiyak disfonksiyona katkıda bulunduğunu düşünmek mantıksal görünmektedir (Altan ve ark., 2007) (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. STZ-diabetin ratlarda β -AR alttiplerinin ekspresyonları üzerindeki etkileri

1.4. AMAÇ

Kardiyak fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan β -AR alttıplerinden β_1 - ve β_2 -AR'lerin fizyolojik koşullardaki fonksiyonları yeterince anlaşılmış olmasına karşın kardiyovasküler hastalıklardaki rolleri henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Buna ek olarak, yaklaşık 10 yıl önce insan kalbinde fonksiyonel olarak bulunan β_3 -AR alttipinin β_1 - ve β_2 -AR'lerin tersine negatif inotropik etkiye aracılık ettiği saptanmıştır (Gauthier ve ark., 1996). Öte yandan, diabetik hastalarda angina pectoris, akut myokard infarktüsü, konjestif kalp yetmezliği ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler komplikasyonların görülme sıklığı sağlıklı bireylere göre çok yüksektir (Kannel ve McGee, 1979). Diabetik ratlarda da streptozotosin enjeksiyonuyla aynı patoloji oluşturulabilmektedir. Bu anlamda, diabetik ratlarda ilk ortaya çıkan belirtilerden biri kardiyak preparatların β -AR agonist stimülasyonuna verdiği inotropik ve kronotropik yanıtların azalmasıdır. Bunun nedenleri henüz tam olarak anlaşılamamasına karşın diabetik ratlarda β_1 -AR ekspresyonunun azaldığı, β_3 -AR ekspresyonunda ise bir artış olduğu saptanmıştır (Dincer ve ark., 2001). Bu bulguya dayanarak ekspresyonu artan β_3 -AR'lerin negatif inotropik etkileri nedeniyle kalp yetmezliği ve diabetik kardiyomyopatide kardiyak fonksiyonların bozulmasına yol açabileceği öne sürülmüştür. Bu noktadan yola çıkarak, çalışmamızda diabetik ratlarda kardiyak β_3 -AR ekspresyonundaki değişikliklerin, bu alttipin aracılık ettiği fonksiyonel yanıtlarda da bir değişikliğe neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Gereçler

2.1.1. Malzemeler

- Disposable Pressure Transducer (MAY, Commat Ltd., Ankara, TÜRKİYE)
- Grass S44 stimulator (Grass Instrument. Inc., Quincy, MA, USA)
- Su banyosu (MAY, Commat Ltd. Ankara, TÜRKİYE)
- Millar Kateter SPR-249 (Houston, ABD)
- Operasyon Masası (Harvard Instrument, Massachusetts, ABD)
- Veri Kayıt ve Analiz Sistemi (MP30 Data Acquisition System, Biopac-System Inc, Santa Barbara-California, ABD)
- %95 Oksijen, %5 karbondioksit içeren gaz karışım tüpü
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-visible-240, JAPONYA)
- Santrifüj (Hettich, EBA 12, Tuttlingen, ALMANYA)
- Santrifüj (Hettich Rotina 35R , Tuttlingen; ALMANYA)
- Otoklav (ALP, Japonya)
- Kaba terazi (Scaltec, SBA 61 Heiligenstadt, ALMANYA)
- Hassas terazi (Scaltec, SBA 31 Heiligenstadt, ALMANYA)
- Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler (Eppendorf, Hamburg, ALMANYA)
- Vortex (Velp Scientifica, İTALYA)
- Pipet uçları (Standart ve RNase free özellikte)

- Spektrofotometre küvetleri (LP Italyano)
- pH metre (Mettler Toledo MP220; İSVİÇRE)
- Mini Santrifüj (Hermle Z160 M, Hersteller Spintron Inc, Wehingen, ALMANYA)
- Quick Santrifüj (Qualitron Inc, KORE)
- -80°C Derin dondurucu (JOUAN VXS 380)
- Likit Nitrojen Tankı
- Buz Makinası (Hosizaki Ice Maker, JAPONYA)
- Çeşitli cam ve plastik malzemeler (Standart ve DNase Free özellikte)
- Cerrahi makas ve pensler
- NanoDrop (NanoDrop Tech., ABD)
- Thermalcycler (ThermoHybaid, ABD)
- Kuru Isıtıcı (Major Science, ABD)
- Elektroforez aleti (SCIE-PLAS, İNGİLTERE)
- Güç kaynağı (SCIE-PLAS, İNGİLTERE)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, TÜRKİYE)
- Isıtıcı karıştırıcı (Torrey Pines Scientific, ABD)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak EDAS 290, ABD)
- 4/0 ipek cerrahi iplik
- İnsülin enjektörleri
- Polietilen enjektörler
- Kronometre

2.1.2. Kimyasal maddeler

- Streptozotosin (Sigma Chemical Co, ABD)
- BRL 37344 (Sigma Chemical Co, ABD)
- SR 59230A (Sigma Chemical Co, ABD)
- Nadolol (Sigma Chemical Co, ABD)
- Ketamin (Ketalar, Pfizer , İstanbul)
- Ksilazin (Alfazyne, Alfasan, Ege Vet. , İzmir)
- NPH insülin (Humulin N, Lilly, İstanbul)
- Krebs çözeltisi (Standart)
- Rat Yemi (Purina, Gebze,Türkiye)
- Moleküler grade izopropil alkol (Riedel, ABD)
- Moleküler grade kloroform (Riedel, ABD)
- ImProm II RT-PCR Kiti (Promega, ABD)
- GoTaq Flexi PCR Kiti (Promega, ABD)
- Primer (IDT, USA)
- Agaroz (Sea-Kem LE agarose, Rockland, Maine, ABD)
- Tris (Applichem, A2264, 1000, Darmstadt, ALMANYA)
- Borik asit (Sigma, B 6768, St. Louis, ABD)
- EDTA (Sigma, E-5134, St. Louis, ABD)
- MOPS tampon çözeltisi (Sigma, St. Louis, ABD)
- Formamid (Sigma, St. Louis, ABD)

- Formaldehid (Sigma, St. Louis, ABD)
- Etidyum Bromür (Sigma, E-7637, St Louis, ABD)
- Absolü Etanol (Riedel, 32221, Sigma-Aldrich, ABD)
- DNA Ladder, (100bp, Promega, ABD)
- Yükleme Boyası (Blue-Orange 6X, Promega, ABD)
- DEPC (Sigma, D-5785, St. Louis, ABD)
- Selüloz Asetat Filtre (0.45µm, Sartorius AG, Goettingen, ALMANYA)

2.1.3. Deney hayvanları

Bu çalışmada Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden sağlanan 200-250 gr. ağırlığında erkek Sprague-Dawley ratlar kullanılmıştır. Çalışma süresince ratlar her biri bireysel kafeslerde olacak şekilde sıcaklığı ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) ve ışıklandırılması (07.00-19.00 saatleri arası aydınlık, 19.00-07.00 saatleri arası karanlık) kontrol altında tutulan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinde barındırılmışlardır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulundan izin alınmıştır.

2.2. Kullanılan Yöntemler

2.2.1. Deneysel Diabetin Oluşturulması

Ratlarda diabet oluşumu streptozotosin (STZ) ile sağlanmıştır. Bunun için pH'sı 4.5 olan 0.1 M sitrat tamponu içinde hazırlanan STZ çözeltisi 40 mg/kg dozda kuyruk veninden I.V injeksiyonla verilmiştir. STZ uygulanan ratlar bireysel kafeslere konulmuş, yem ve su kısıtlaması uygulanmamıştır. STZ injeksiyonundan 72 saat sonra ratların kuyruklarından kan alınarak kan glukoz konsantrasyonları ölçülmüş ve kan glukoz konsantrasyonları 300 mg/dl ve üzerinde olan ratlar 'diabetik' olarak

kabul edilmiştir. Kalplerini çıkarmak üzere öldürdükleri 8 hafta sonunda kan glukoz konsantrasyonları yeniden belirlenmiştir.

Sitrat tamponu hazırlanması:

2.94g Na sitrat tartılarak distile su içinde çözülmüş ve hacmi 100 ml'ye ayarlanmıştır. 1N HCl ile pH'sı 4.5'a ayarlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

2.2.2. Deney Grupları

Çalışmamızda ratlar "Kontrol" (K), "Diabetik"(D) ve "İnsulin Tedavili Diabetik "(İ) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. İnsulin Tedavili Diabetik grupta insulin tedavisine STZ injeksiyonundan 5 hafta sonra başlanmış ve 3 hafta sürdürülmüştür. Kullanılan insulin dozları, sabah ve akşam ölçülen kan glukoz konsantrasyonları doğrultusunda 10-40IU/kg doz aralığında belirlenmiştir.

Ratların beden ağırlıkları haftalık olarak izlenmiştir.

Deney günü ratların beden ağırlıkları kaydedilip kuyruk veninden kan alınarak kan glukoz düzeylerine bakılmıştır. Sonrasında ratlar 60 mg/kg ketamin (i.p) ile anestezi edilerek kalpler çıkarılmıştır.

2.2.3. *In-vivo* Hemodinamik Ölçümler (Millar Kateterizasyonu)

Ketamin (60mg/kg)/ksilazin (10mg/kg) (i.p.) kombinasyonu ile anestezi edilen ratlar özel operasyon masasına yatırılıp sabitlenmiştir. Operasyon masasına bağlı rektal prob yardımıyla ratların vücut ısısı operasyon süresince sabit tutulmuştur. Ratların sağ karotid arteri içine Millar (SPR-249) kateter yerleştirilmiştir. 5 dakika süreyle sistolik ve diastolik kan basıncı değerleri alındıktan sonra Millar kateter sol ventrikül içine doğru ilerletilmiştir. 10 dakikalık stabilizasyon süresince bazal sol ventrikül basıncı (LVP) ve kalp atım hızı değerleri ölçülmüş, sonrasında da kalbin kasılma (+dp/dt) ve gevşeme (-dp/dt) hızlarının göstergesi olan $\pm dp/dt$ değerleri, sol ventrikül diastol sonu basıncı (LVEDP) ve sol ventrikül içi gelişen basınç (LVDP)

hesaplanmıştır. Bütün verilerin kayıtları ve analizlerinde “Biopac Data Aquisition System” (Biopac System, Inc., Santa Barbara, CA) kullanılmıştır.

2.2.4. İzole Organ Banyosu Deneyleri (Langendorff Kalp Preparatı)

Ketamin (60mg/kg)/ksilazin (10mg/kg) (i.p) kombinasyonu ile anestezi edilen ratların göğüs kafesleri açılarak kalp, üzerinde en az 2 cm aorta kalacak şekilde çıkartılmış ve içinde buz olan Krebs-Henseleit çözeltisine konulmuştur. Daha sonra kalp aortadan Langendorff kanülüne takılarak çevresindeki dokular temizlenmiş ve 4.0 ipek iplikle aorta üzerinden bağlanmıştır. Bu şekilde sisteme takılan kalpler Krebs-Henseleit çözeltisi ile dakikada 10ml hızla perfüze edilmiştir. Deneylerde kullanılan Krebs-Henseleit çözeltisinin içeriği şöyledir: NaCl 120, NaHCO₃ 25, Glukoz 10, KCl 4.8, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.25, CaCl₂ 1.25 (mmol/L). Deney süresince perfüzyon sıvısının sıcaklığı sirkülatörlü su banyosu ile 37°C’de, pH’sı ise %95 O₂ + %5 CO₂ gaz karışımı ile 7.4’de sabit tutulmuştur. LVDP ve öteki parametreleri ölçmek için bir ucu “basınç transducer”ına bağlı olan lateks balon boş şekilde sol ventrikül içine yerleştirilmiş ve balonun içindeki hacim LVEDP 10 mmHg olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından apekse elektrot yerleştirilerek kalpler dakikada 300 atım olacak şekilde stimüle edilmiştir. Sonrasında kontrol ve diabetik kalplerin β_3 -AR agonisti BRL 37344’e verdiği fonksiyonel yanıtlar, nonspesifik β -AR antagonisti nadolol ve β_3 -AR antagonisti SR 59230A varlığında/yokluğunda ölçülmüştür. Bir başka anlatımla, LVDP, LVEDP, +dp/dt, -dp/dt değerleri MP100 (Biopac System, Inc., Santa Barbara, CA) veri-kayıt sistemi ile kaydedilip sonrasında analizleri yapılmıştır.

2.2.4.1. BRL 37344 Konsantrasyon-Yanıt Çalışmaları

Stabilizasyon süresinden sonra kalplerin BRL 37344'e yanıt verirliliğini araştırmak için 10^{-10} ile 10^{-6} mol/L aralığındaki konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir.

2.2.4.2. BRL 37344 ve Nadolol Konsantrasyon-Yanıt Çalışmaları

10^{-5} mol/L konsantrasyonunda nadolol ile inkübe edilen kalplerin BRL 37344'e yanıt verirliliğini araştırmak için 10^{-10} ile 10^{-6} mol/L aralığındaki konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir.

2.2.4.3. BRL 37344 ve SR 59230A Konsantrasyon-Yanıt Çalışmalar

10^{-7} mol/L konsantrasyonunda SR 59230A ile inkübe edilen kalplerin BRL 37344'e yanıt verirliliğini araştırmak için 10^{-10} ile 10^{-6} mol/L aralığındaki konsantrasyon yanıt eğrileri elde edilmiştir.

2.2.5. Total RNA Ekstraksiyonu:

Eksi 80°C 'de saklanan kalp dokusu, içinde likit nitrojen bulunan porselen havanda toz edilmiştir. İçinde 1 ml trizol çözeltisi bulunan steril tüplere toz edilen kalp dokusu konulmuş ve üstüne 1 ml trizol çözeltisi daha eklenmiştir. Sonrasında ultrasonik homojenizatörde homojenizasyon yapılmış ve çözeltiler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Alınan supernatant oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş, üzerine supernatantın 0,2 ml katı kloroform eklenmiş, 15 saniye güçlü bir şekilde çalkalanmış ve yine 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki berrak faz alınmıştır. Üstüne trizol kadar isopropil alkol eklenmiş ve 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Bu kez supernatant atılmış ve pellete 900µl %75 etanol eklenerek 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında 400µl etanol ile yıkama işlemi yinelenmiştir. En son

olarak etanol uzaklaştırılmış, pellet 10 dakika oda sıcaklığında kurutulmuş ve 60 µl nükleaz içermeyen su ile çözülmüş ve spektrofotometrede OD değerleri ve konsantrasyonu okunmuştur. OD değerleri 1,7'nin altında olan örnekler deneylere alınmamıştır.

2.2.5.1. Total RNA jeli

Elde edilen total RNA'ların kalitesini test etmek için formaldehit agaroz jeli hazırlanarak, tRNA örnekleri bu jele yüklenmiş, elektroforez işlemi uygulanmış, sonrasında görüntüleme sisteminde jelin fotoğrafı çekilmiştir. Bu jelde her örnek için DNA'nın 18S ve 28S bandlarını gösteren 2 ayrı band görülmektedir ve bunlardan 28S bandı 18S bandının yaklaşık 2 katı kadar parlaktır. Bu görüntü, elde edilen tRNA kalitesinin iyi olduğunu göstermektedir.

Jelin Hazırlanması:

1,5 g agaroz tartıldıktan sonra 72 ml steril su ile karıştırılmış ve mikrodalgada ısıtılmıştır. Sonrasında 55°C'ye kadar soğutulurak üzerine 10ml 10X MOPS çözeltisi ve 18 ml deiyonize formaldehid eklenmiştir. Steril koşullara uygun olarak hazırlanan jel, tepsiye dökülerek en az 1 saat süreyle soğuması beklenmiştir.

Örneklerin hazırlanması:

Steril tüplere 2µl (20µg'a kadar) RNA, 2µl 10X MOPS, 4µl formaldehid, 10µl formamid ve 1µl EtBr (200 µg/ml) konularak 55°C de 1 saat ya da 85°C de 10dakika ısıtılmıştır. Buzda soğutulduktan sonra hızlı santrifüj yapılmıştır. Sonrasında tüplere 5µl 6xdye konulmuş ve karıştırılmıştır.

Hazırlanan jele 1X MOPS'dan üzerini kapatacak kadar eklendikten sonra numuneler yüklenmiş, iki elektrod arasına cm'ye 4-5V akım uygulanarak 4-5 saat elektroforez işlemi uygulanmıştır.

2.2.5.2. RT-PCR

RT-PCR'in (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) ilk adımında total RNA'dan oligo dt primer'la mRNA'lar elde edilmiştir. Daha sonra mRNA'lardan "revers transkriptaz" enzimiyle cDNA iplikçikleri elde edilmiştir.

En az 1 µg total RNA'sı olan örnekler en düşük konsantrasyona sahip olana göre hesaplanarak (µl RNA) nükleaz içermeyen su ile toplam 4 µl'ye tamamlanmıştır. Üzerine 1 µl oligo dt primer eklenmiş ve PCR cihazında 70°C'de 5 dakika tutulmuştur. Daha sonra örnekler üzerine sırasıyla çizelge 2.1'dekiler eklenmiştir.

Su	6,1 µl
5X Tampon	4,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl
dNTP	1,0 µl
Rnazin	0,5µl
RT(Reverse transkriptase)	1,0 µl

Çizelge 2.1: RT-PCR reaksiyonu bileşenleri.

Final hacmi 20µl olan örneklere PCR cihazında çizelge 2.2'deki program uygulanmıştır.

25°C	5 dk
42 °C	60 dk
70 °C	15 dk
4 °C	5 dk

Çizelge 2.2: RT-PCR programı.

2.2.5.3. PCR

RT-PCR ile elde edilen cDNA iplikçikleri Taq DNA polimeraz enzimi varlığında çoğaltılmıştır. β -aktin ve β_3 -AR ayrıca $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$ ve eNOS olmak üzere beş farklı primer'la çalışılmıştır. Tüplere çizelge 2.3'de gösterilen maddeler konulmuş ve çizelge 2.4'de gösterilen program uygulanmıştır.

cDNA	1,0 μ l
5X Tampon	10,0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2,4-3*
dNTP	1,0 μ l
Taq	0,2 μ l
Primer (10 pmol/ml)	2,0 μ l
Primer (10 pmol/ml)	2,0 μ l
Nükleaz içermeyen su	(-)* μ l
Toplam Hacim	50 μ l

Çizelge 2.3: PCR reaksiyonu bileşenleri. *Her deney için MgCl₂, cDNA, ve primer hacimlerine göre gereken su miktarı toplam 50 μ l'den çıkarılarak hesaplanır. *Farklı primerlar için farklı MgCl₂ konsantrasyonu seçilmektedir

Denatürasyon	94 °C	3 dk	94 °C	1,5 dk	72°C	10 dk
Tutunma*	50-60 °C	1 dk	50-60°C	1 dk	4 °C	5 dk
Uzama	72 °C	2 dk	72 °C	2 dk		
	1 Döngü		35 Döngü		1 Döngü	

Çizelge 2.4: PCR programı. * her primer için spesifik tutunma derecesi vardır.

Primer Adı	MgCl ₂ (25mM)	Tutunma Derecesi(°C)	Ürün Büyüklüğü(BP)
β-aktin	2,4	58	387
β ₃ -AR	2,4	58	444
G _{ia2}	2,4	60	404
G _{ia3}	2,4	60	249
eNOS	3,0	60	553

Çizelge 2.5: PCR reaksiyon koşulları

2.2.5.4. Jel Elektroforezi

Agaroz jel kasetine tarak yerleştirilmiştir. Yüzde 1-1.5'lük agaroz jel hazırlamak için, bir erlene 0.9-1.35 g agaroz tartılarak 90 ml 10XTBE elektroforez tamponu eklenmiş ve mikrodalga fırında çözülmüştür. Yaklaşık 40-45°C'ye soğutularak final konsantrasyonu 0.3 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik etidyum bromürden 2,7 µl eklenmiştir. Jel kasete dökülerek 30-60 dakika süre ile donması beklenmiş ve sonra taraklar çıkarılarak içinde 10X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Örnekler üzerine 6xdye (Blue-Orange) konulmuş ve jel üzerindeki yuvalara uygulanarak 1Kb'lik DNA ladder varlığında sinyallerin yeri saptanmıştır. 90 dakika boyunca elektroforez işlemi uygulanan sinyaller "Kodak EDAS 290" sistemi ile UV ışığı altında görüntülenmiştir. Jel fotoğraflarının analizi Kodak 1D 3.6 programı ile yapılmıştır. Her bir sinyal yoğunluğu internal kontrol primerle (beta aktin) oluşan sinyalin yoğunluğuna oranlanarak istatistiksel anlamlılık araştırılmıştır.

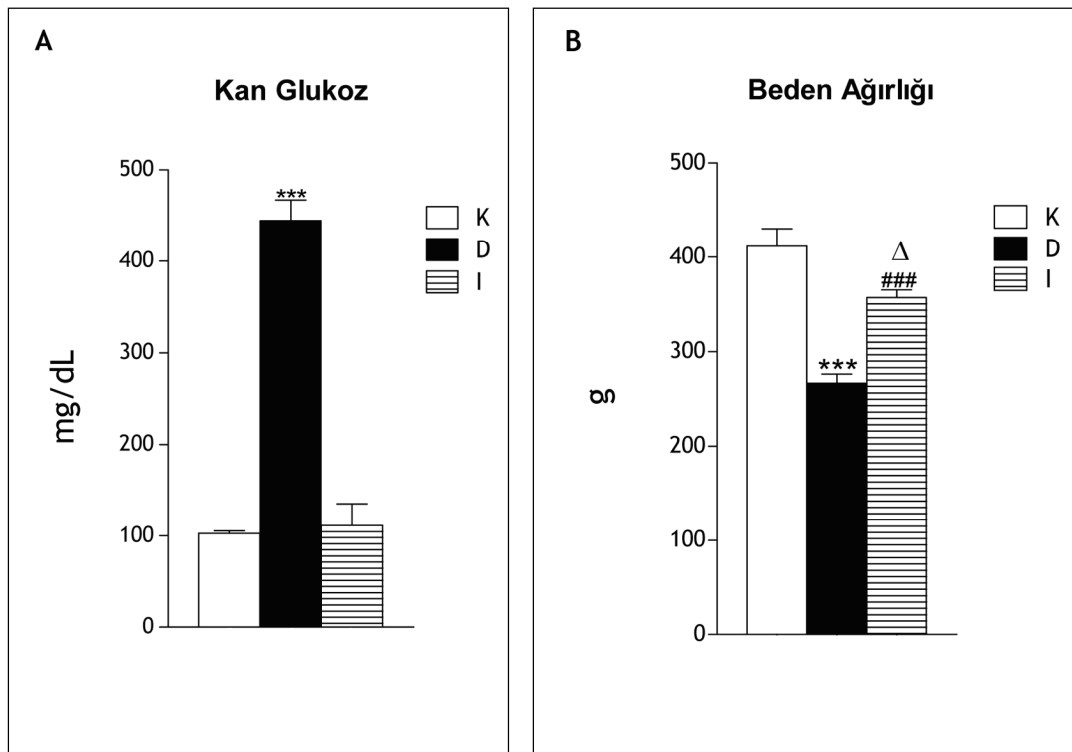
2.3. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, belli sayıda (n) deney sonucundan elde edilen ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için GraphPad PRISM 5 (for Windows, Version 5.0) programı kullanılarak unpaired t testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

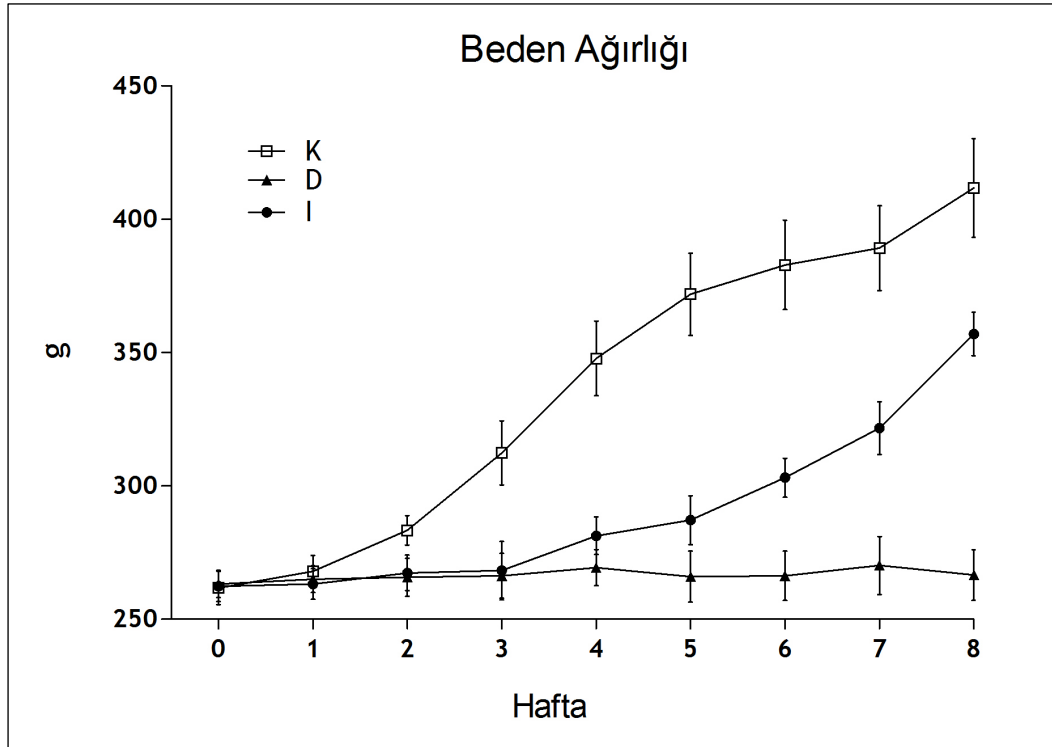
3.1. Ratların Genel Özellikleri

Sprague-Dawley ratlara uygulanan 40mg/kg (i.v) STZ injeksiyonundan 72 saat sonra yapılan ölçümlerde kan glukoz düzeyleri 300 mg/dL'nin üzerinde olan ratlar diabetik olarak değerlendirilmiştir. *In vivo* ölçümler için deneye alındıkları 8 haftanın sonunda alınan kan örneklerinde yapılan glukoz ölçümlerinde, diabetik ratların kan glukoz düzeylerinin anlamlı bir biçimde yükseldiği, insulin tedavisinden sonra ise kontrol düzeylere geri döndüğü belirlenmiştir (kontrol 102.4 ± 3.1 mg/dL; diabetik 444.4 ± 22.9 mg/dL; insulin tedavili diabetikler 111.25 ± 23.9 mg/dL) (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. 8 hafta sonunda (*in vivo* deneyler öncesinde) ölçülen A) kan glukoz düzeyleri ve B) beden ağırlıkları. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. ***, $p < 0.001$, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı fark, ###, $p < 0.001$, diabetiklerle insulin tedavili diabetikler arasında anlamlı fark, Δ, $p < 0.05$, kontrollerle insulin tedavili diabetikler arasında anlamlı fark.

Öte yandan, 8 haftalık dönemde kontrol ve diabetik ratların büyüme profillerinin belirgin bir farklılık gösterdiği saptanmıştır (Şekil 3.2). Sözü edilen dönem sonunda diabetik ratların beden ağırlıkları kontrollere oranla oldukça düşük kalmıştır. Deneylerin başlangıcında (0.gün) kontrol ratların 262.6 ± 6.6 g olarak saptanan beden ağırlıkları 8 hafta sonunda 411.7 ± 18.5 g'a ulaşmıştır. Ne var ki, diabetik ratların deneylerin başlangıcında (STZ injeksiyonu yapıldığı gün) 263.2 ± 5.1 g olan beden ağırlıkları 8 hafta sonunda ancak 266.6 ± 9.5 g olarak bulunmuştur. Buna ek olarak, günlük insulin tedavisinin diabetik ratların büyüme profilini kısmen düzelttiği belirlenmiştir. Deney başlangıcında 262.4 ± 5.7 g olan beden ağırlıkları deney sonunda 357 ± 8.1 g'a ulaşmasına karşın yine de kontrol değerlerin altında kalmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.2. Ratların haftalık beden ağırlığı ölçümleri. Değerler, ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir.

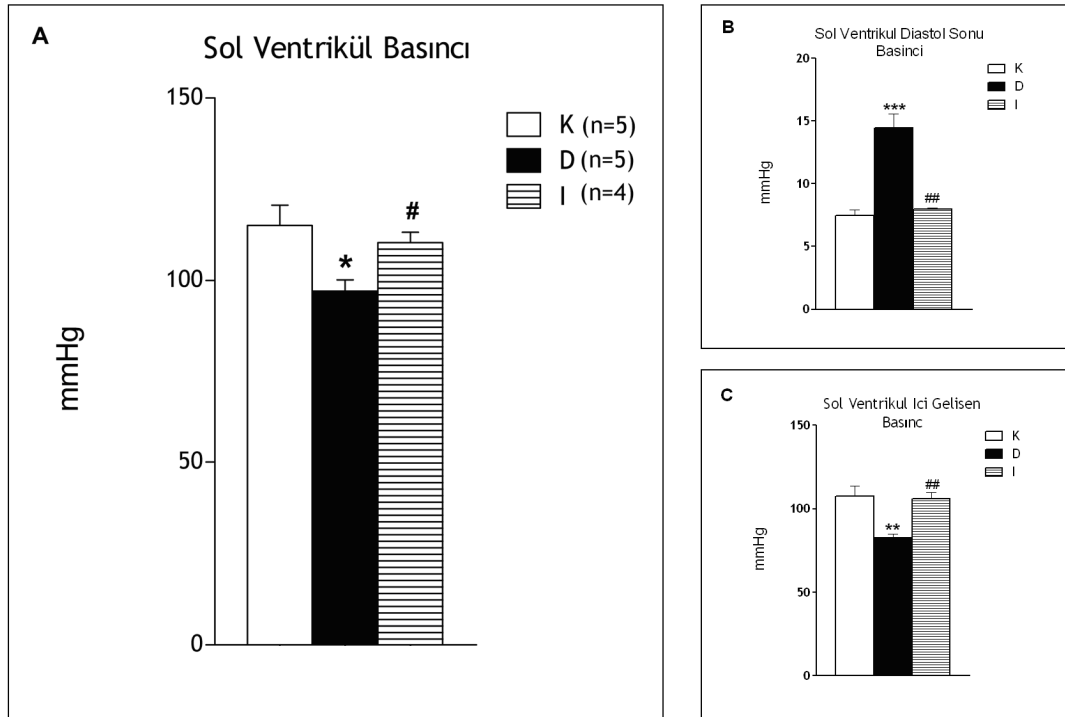
3.2. *In Vivo* Ölçümler

8 hafta sonunda anestezi altındaki ratlarda *in vivo* kardiyak hemodinamik parametreler ölçülmüştür. Sonuçlarımız, beklendiği gibi diabetin kardiyak hemodinamik parametreleri bozduğunu, insulin tedavisinin ise diabette bozulan parametreleri kontrol değerlere yaklaştırdığını göstermektedir.

	Kontrol (n=5)	Diabetik (n=5)	İnsulin Tedavili Diabetik (n=4)
Sol Ventrikül Basıncı (LVP)	115.1±5.6	97.1±3.1*	110.4±2.9 [#]
Sol Ventrikül Diastol Sonu Basıncı (LVEDP)	7.5±0.5	14.5±1.1***	8.0±0.1 ^{##}
Sol Ventrikül İçi Gelişen Basınç (LVDP)	107.6±6.0	82.6±2.1**	106.0±3.9 ^{##}

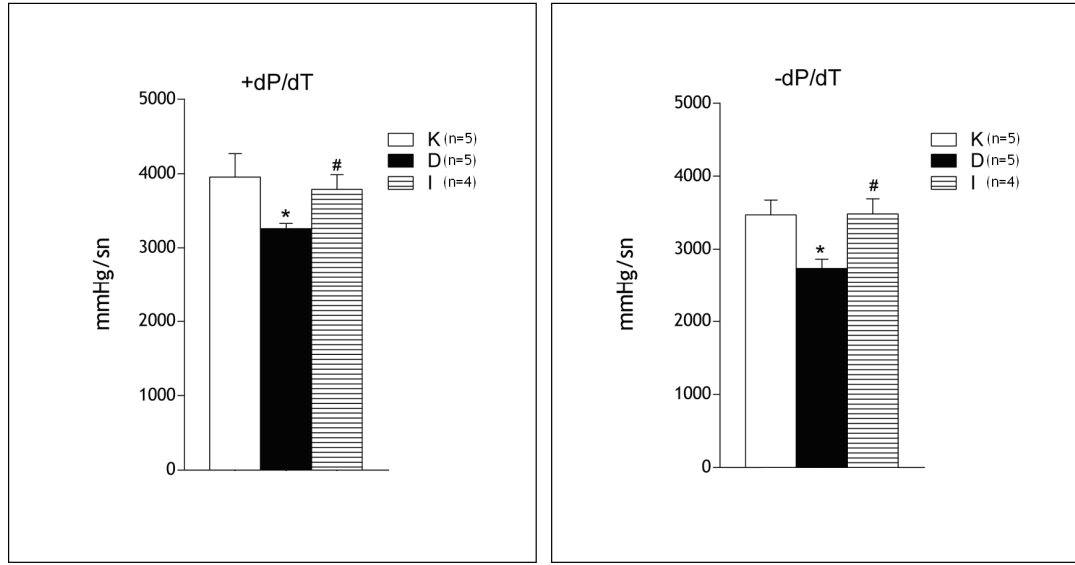
Çizelge 3.1. Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik ratların sol ventrikül basıncı, sol ventrikül diastol sonu basıncı ve sol ventrikül içi gelişen basınç değerleri. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı fark, #, p<0.05, ##, p<0.01, diabetiklerle insülin tedavili diabetikler arasında anlamlı fark.

Anestezi altındaki ratlardan Millar kateter kullanılarak alınan kardiyak ölçümler çizelge 3.1’de gösterilmiştir. 8 hafta sonunda LVP ve LVDP’nin diabetik ratlarda kontrollere oranla belirgin olarak azaldığı, buna karşın LVEDP’nin tam tersine belirgin olarak arttığı saptanmıştır. İnsulin tedavisi uygulanan diabetik ratlarda ise sözü edilen parametreler kontrollerden farksız bulunmuştur (Şekil 3.3).



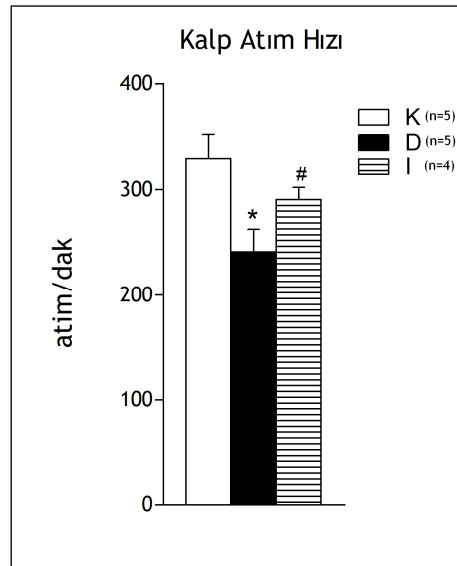
Şekil 3.3. *In vivo* olarak ölçülen A) sol ventrikül basıncı, B) sol ventrikül diastol sonu basıncı ve C) sol ventrikül içi gelişen basınç değerleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı fark, #, $p<0.05$, ##, $p<0.01$, diabetiklerle insulin tedavili diabetikler arasında anlamlı fark.

Birim zamanda sol ventrikül basıncındaki değişimleri gösteren dP/dt değerleri diabetiklerde, kontrol ve insulin tedavili diabetiklerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Kalbin birim zamandaki kasılma hızının göstergesi olan $+dP/dt$ değeri kontrollerde 3955.4 ± 312.5 , diabetiklerde 3207.8 ± 73.1 ve insulin tedavili diabetiklerde 3785.5 ± 197.5 olarak saptanmıştır. Kalbin birim zamandaki gevşeme hızının göstergesi olan $-dP/dt$ değeri ise kontrollerde 3467.6 ± 205.4 , diabetiklerde 2736 ± 127.8 ve insulin tedavili diabetiklerde de 3483.2 ± 206.6 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.4).



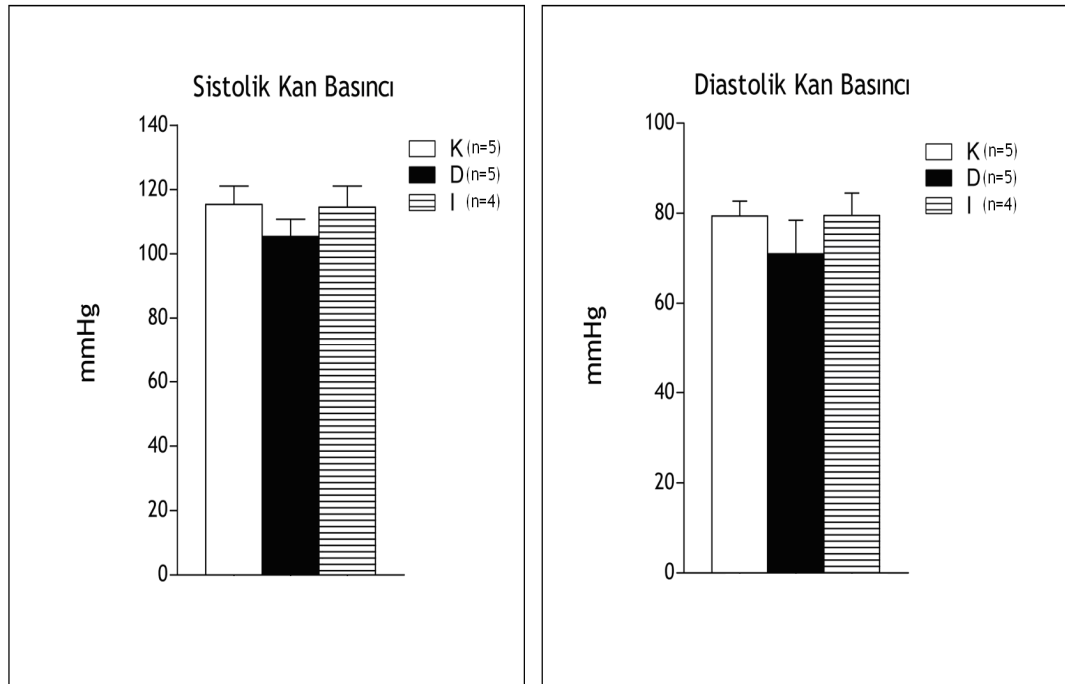
Şekil 3.4. *In vivo* olarak ölçülen dP/dt değerleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. *, $p < 0.05$, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı fark, #, $p < 0.05$, diabetiklerle insülin tedavili diabetikler arasında anlamlı fark

8 hafta sonrasındaki kalp atım hızı değerleri ise diabetik ratlarda kontrollere oranla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. İnsülin tedavisi ise diabetik ratların kalp atım hızı değerlerini kontrol düzeylere geri döndürmüştür (kontrol 329.4 ± 22.8 atım/dak; diabetik 241.4 ± 21.2 atım/dak; insülin tedavili diabetik 290.8 ± 11.5 atım/dak) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *In vivo* olarak ölçülen kalp atım hızı değerleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. *, $p < 0.05$, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı fark, #, $p < 0.05$, diabetiklerle insülin tedavili diabetikler arasında anlamlı fark.

Öte yandan, 8 hafta sonunda kan basıncı değerlerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir (Sistolik kan basıncı: kontrol 115.4 ± 5.6 ; diabetik 105.4 ± 5.3 ; insulin tedavili diabetik 114.5 ± 6.6 . Diastolik kan basıncı: kontrol 79.4 ± 3.3 ; diabetik 71 ± 7.5 ; insulin tedavili diabetik 79.5 ± 4.9) (Şekil 3.6).



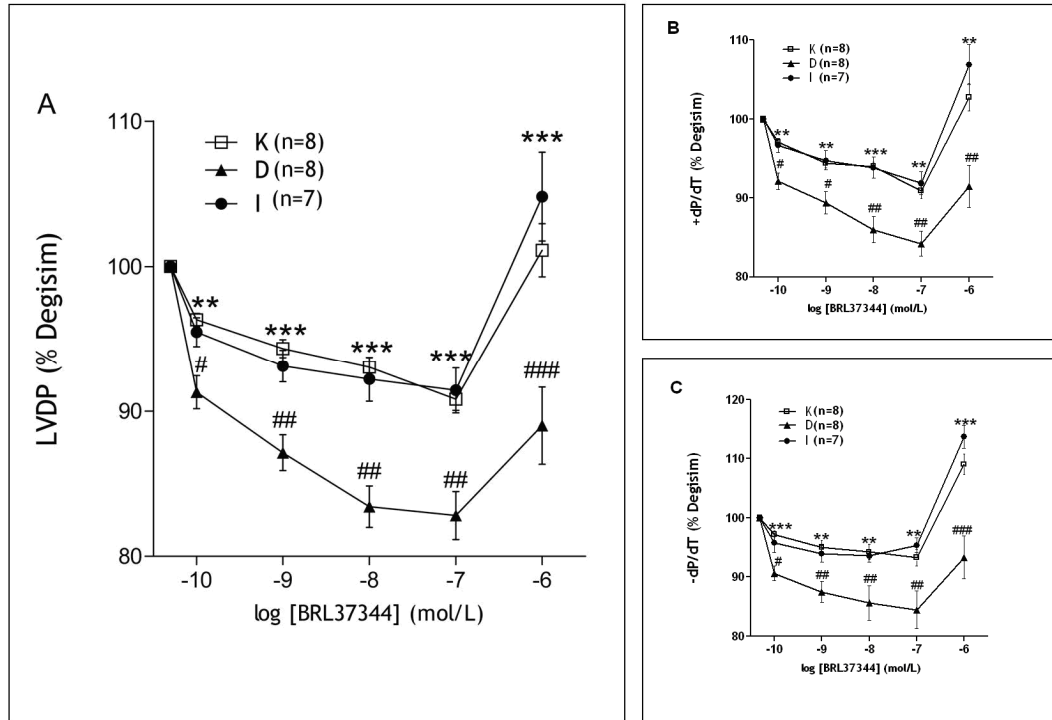
Şekil 3.6. *In vivo* olarak ölçülen kan basıncı değerleri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir.

3.3. İzole Organ Banyosu Deneyleri

3.3.1. BRL 37344 Konsantrasyon-Yanıt Çalışmaları

Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik ratlardan 8 hafta sonunda izole edilen kalplerde Langendorff tekniği kullanılarak BRL 37344'ün 10^{-10} - 10^{-6} mol/L konsantrasyon aralığında oluşturduğu LVDP, $+dP/dt$ ve $-dP/dt$ yanıtları elde edilmiştir. BRL 37344'ün kontrol ratlarda konsantrasyon-bağımlı negatif inotropik etki oluşturduğu ve sözü edilen etkinin diabetik ratlarda belirgin olarak arttığı bulunmuştur. Ne var ki, 10^{-6} mol/L konsantrasyonda negatif inotropik etkinin pozitif inotropik etkiye dönüştüğü saptanmıştır. LVDP yanıtlarına benzer şekilde, BRL

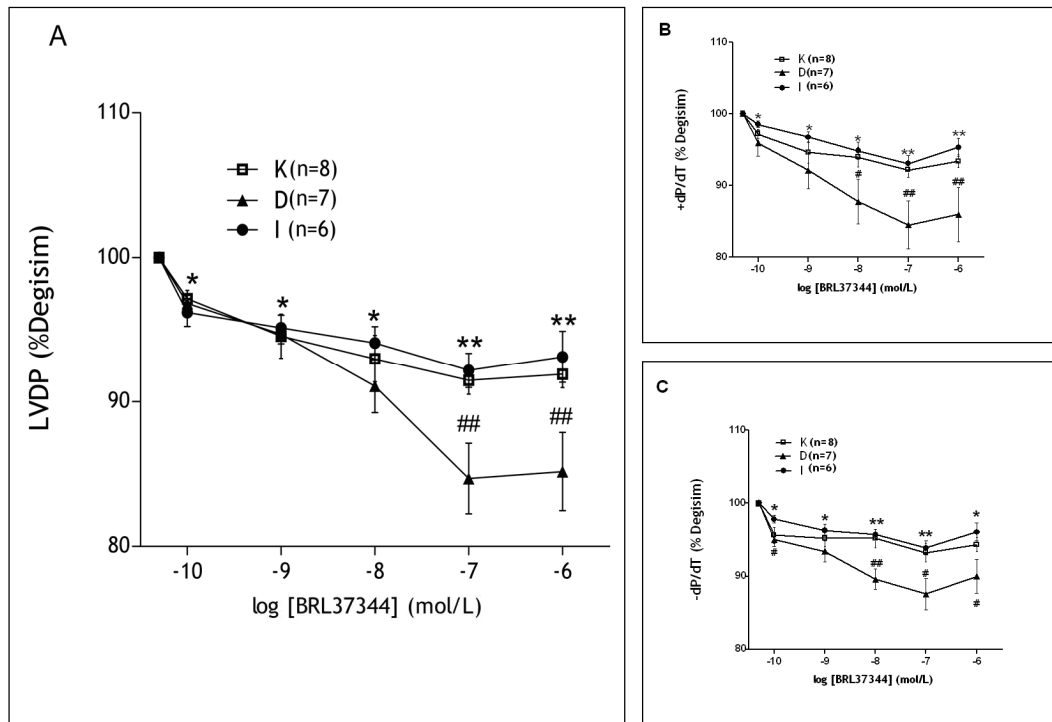
37344'ün kontrol ratlarda +dP/dt ve -dP/dt değerlerini de azalttığı ve bu etkinliğinin diabetik ratlarda anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. BRL 37344'ün 10^{-6} mol/L konsantrasyonda ise hem +dP/dt hem de -dP/dt değerlerini arttırdığı saptanmıştır. İnsulin tedavili diabetik ratlarda ise BRL 37344'ün her üç parametre üzerinde oluşturduğu etkiler, kontrol ratlarda oluşturduğu değerlerden farksız bulunmuştur (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. BRL 37344'ün konsantrasyon-yanıt eğrileri. A) Sol ventrikül içi gelişen basınç (LVDP). B) +dP/dt. C) -dP/dt. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı fark, #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$, ###, $p < 0.001$, diabetiklerle insülin tedavili diabetikler arasında anlamlı fark.

3.3.2. BRL 37344 ve Nadolol Konsantrasyon-Yanıt çalışmaları

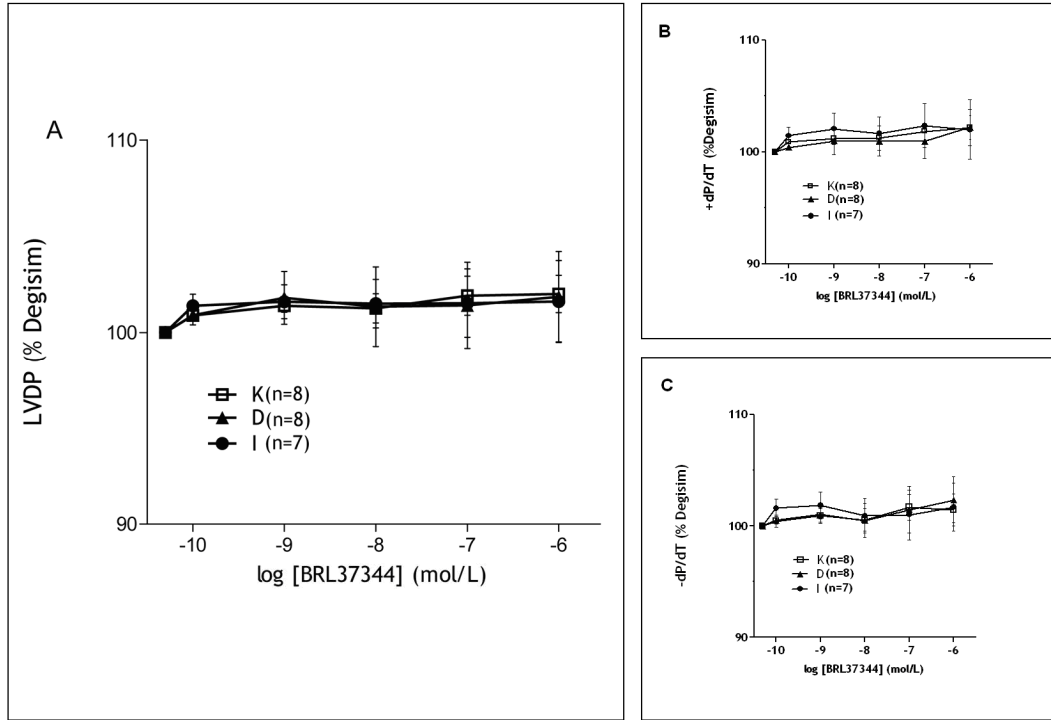
BRL 37344'ün LVDP, +dP/dt ve -dP/dt yanıtlarında oluşturduğu değişimlerin β_3 -AR aracılı olup olmadığının belirlenebilmesi için 10^{-10} - 10^{-6} mol/L konsantrasyon aralığında oluşturduğu etkiler nonselektif β -AR antagonisti varlığında da araştırılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, β_1 -/ β_2 -AR antagonisti nadolol (10^{-5} mol/L) inkübasyonunun ardından yapılan konsantrasyon-yanıt çalışmasında BRL 37344 ile uyarılan LVDP, +dP/dt ve -dP/dt yanıtları saptanmıştır (Şekil 3.8). Sözü edilen yanıtların nadolol varlığında değişmemesi, BRL 37344'ün bu parametreler üzerindeki etkinliğinin β_1 -/ β_2 -AR aracılığıyla değil β_3 -AR'ler aracılığıyla oluştuğunu, düşündürmektedir.



Şekil 3.8. BRL 37344'ün nadolol varlığında elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. A) Sol ventrikül içi gelişen basınç (LVDP). B) +dP/dt. C) -dP/dt. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı fark, #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$, diabetiklerle insülin tedavili diabetikler arasında anlamlı fark.

3.3.3. BRL 37344 ve SR 59230A Konsantrasyon-Yanıt çalışmaları

BRL 37344'ün LVDP, +dP/dt, -dP/dt üzerindeki etkilerinin β_3 -AR aracılığıyla oluştuğunun doğrulanabilmesi amacıyla selektif β_3 -AR antagonisti SR 59230A (10^{-7} mol/L) kullanılmıştır. SR 59230A varlığında BRL 37344 'ün sözü edilen parametreler üzerindeki etkilerinin tüm gruplarda ortadan kalktığı gözlenmiştir (Şekil 3.9). Bu da BRL 37344'ün çalıştığımız sistemdeki etkilerinin β_3 -AR aracılığıyla oluştuğunun doğrudan bir kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

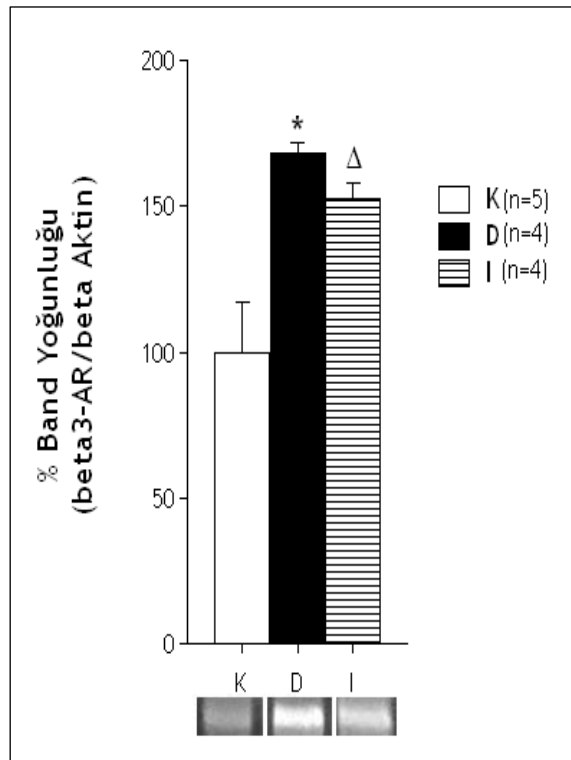


Şekil 3.9. BRL 37344'ün SR 59230A varlığında elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri. A) Sol ventrikül içi gelişen basınç (LVDP). B) +dP/dt. C) -dP/dt. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir.

3.4. β_3 -AR Altıtipi, $G_{i\alpha 2}$ ve eNOS mRNA Ekspresyonları

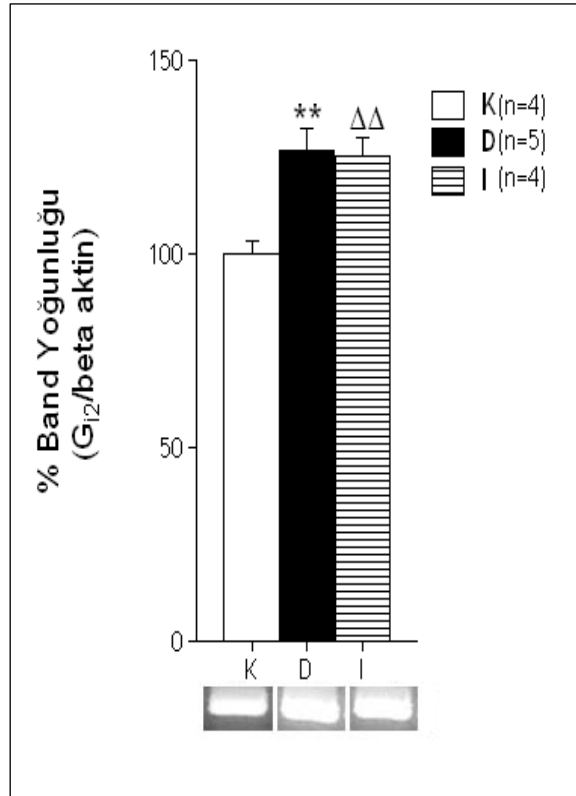
Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik rat kalplerinde β_3 -AR, $G_{i\alpha 2}$ ve eNOS mRNA ekspresyonları RT-PCR tekniğiyle belirlenmiştir. Okunan band yoğunlukları kontrol primer olan beta aktin band yoğunluklarına oranlanarak ifade edilmiş ve gruplar karşılaştırılmıştır.

Kardiyak β_3 -AR mRNA ekspresyonunun diabetiklerde kontrollere oranla anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. İnsulin tedavisinden sonra diabette artan β_3 -AR mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptanmıştır. Bir başka anlatımla, insulin tedavili diabetik ratlarda β_3 -AR mRNA ekspresyonu, diabetik ratlarda gözlemlendiği gibi, kontrollerden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. (kontrol, 100 ± 17.2 ; diabetik, 167.9 ± 3.9 ; insulin tedavili diabetik, 152.3 ± 6.1) (Şekil 3.10).



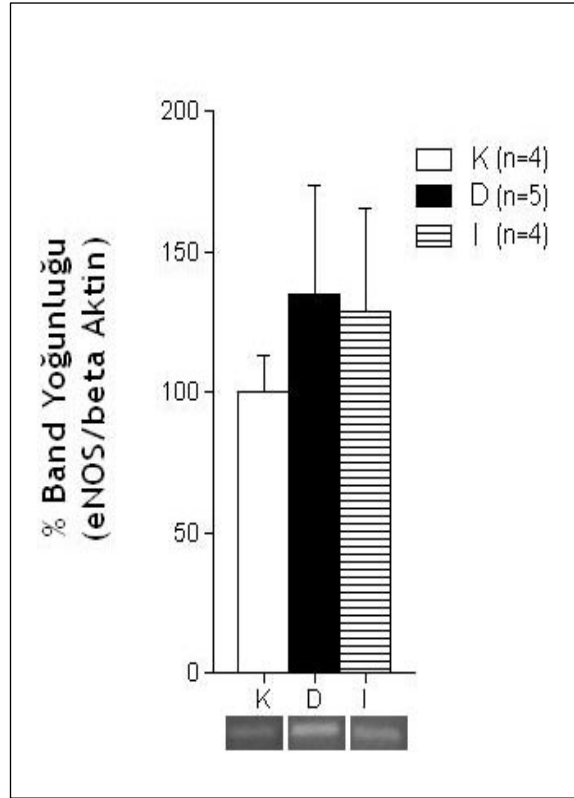
Şekil 3.10. Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik ratlarda β_3 -AR mRNA ekspresyonlarına ilişkin band yoğunlukları ve band fotoğrafları. (*, $p < 0.05$, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı farklılık; Δ , $p < 0.05$, kontrollerle insulin tedavili diabetik ratlar arasında anlamlı farklılık).

Bunun yanısıra, diabetik ratlarda kardiyak $G_{i\alpha 2}$ mRNA ekspresyonunun, β_3 -AR'lerde olduğu gibi, kontrollere göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. İnsulin tedavisi ise diabetik ratlarda artan $G_{i\alpha 2}$ mRNA ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki oluşturmamıştır (kontrol, 100 ± 3.47 ; diabetik, 126.83 ± 4.91 ; insülin tedavili diabetik, 125.18 ± 4.65) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik ratlarda $G_{i\alpha 2}$ mRNA ekspresyonlarına ilişkin band yoğunlukları ve band fotoğrafları. (**, $p < 0.01$, kontrollerle diabetikler arasında anlamlı farklılık; $\Delta\Delta$, $p < 0.01$, kontrollerle insülin tedavili diabetik ratlar arasında anlamlı farklılık).

Öte yandan, kardiyak eNOS ekspresyonları ise diabetiklerde artmasına karşın gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (kontrol, 100 ± 12.91 ; diabetik, 134.76 ± 39.03 ; insülin tedavili diabetik, 128.47 ± 37.02).



Şekil 3.12. Kontrol, diabetik ve insülin tedavili diabetik ratlarda eNOS mRNA ekspresyonlarına ilişkin band yoğunlukları ve band fotoğrafları.

4. TARTIŞMA

Kardiyovasküler komplikasyonlar günümüzde diabetik morbidite ve mortalitenin temel nedenini oluşturmaktadırlar. İnsulinin klinikte kullanılmaya başlanmasından önce diabetik ketoasidozis diabetik hastaların en önde gelen ölüm nedeni olmasına karşın bu “dönüm noktası”ndan sonra süreç içinde gelişen kardiyovasküler problemler ketoasidozisin yerini almıştır. Klinik ve deneysel çalışmalarda diabette gözlenen kardiyak sorunlara yol açan faktörlere ilişkin çok sayıda bulgu elde edilmesine karşın etiyolojiye ilişkin özellikler henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ne var ki, diabetiklerde angina pectoris, akut myokard infarktüsü, konjestif kalp yetmezliği ve aterosklerotik hastalık riskinin non-diabetiklere oranla belirgin olarak arttığı bilinmektedir (Kannel ve McGee, 1979). Konjestif kalp yetmezlikli populasyonun yaklaşık %30’unu diabetik hastalar oluşturmaktadır (Solang ve ark., 1999). Buna ek olarak, myokard infarktüsü geçirmiş diabetik hastalarda kalp yetmezliğine geçiş sıklığının arttığı (Sowers ve ark., 2001; Massie ve ark., 2002) ve kronik kalp yetmezlikli hastaların önemli bir bölümünün hiperglisemik olmaları da hiperinsulinemik ve insuline dirençli oldukları bildirilmiştir (Swan ve ark., 1994). Öte yandan, diabetik hastalarda ateroskleroz, hipertansiyon, mikroangiopati, makroangiopati ve otonomik nöropati gibi kardiyak risk faktörlerinden bağımsız olarak da kardiyak komplikasyonların oluşabileceği gösterilmiştir. Kaldı ki, diabetin kendisi de kardiyomyositlerde patolojik değişimleri tetikleyebilmektedir. Sözü edilen bulgular diabete özgü bir kardiyomyopatinin (diabetik kardiyomyopati) mortalite ve morbiditenin en önde gelen nedeni olabileceğini düşündürmektedir (Sharma ve McNeill, 2006).

Diabetin yol açtığı kardiyak değişimlerin etiyolojisine ilişkin ayrıntıların anlaşılabilmesi kontrollü deneysel araştırmalarla olanaklıdır. Bu amaç doğrultusunda en çok STZ ile diabetik yapılan ratlar ya da spontan diabetik BB ratlar kullanılmaktadır. Diabetik ratlarda en önce gözlenen kardiyak komplikasyon kardiyak preparatların β -AR agonist uyarılarına verdiği pozitif inotropik ve pozitif kronotropik yanıtlarda ortaya çıkan azalmadır (Vadlamudi ve McNeill, 1984; Karasu ve Altan,

1993; Yu ve McNeill, 1991; Özuarı ve ark., 1993). Kalp dokusunun β -AR agonistlerine yanıt verilişindeki azalmaya yol açan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ne var ki, bunun diabette kardiyak β -AR ekspresyonundaki azalmayla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Sundaresan ve ark., 1984; Latifpour ve McNeill, 1984; Gando ve ark., 1997). Gerçekten de diabetik ratlarda kardiyak β -AR ekspresyonunda gözlenen %28'lik bir azalmaya kalp atım hızındaki %24'lük bir azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir (Savarese ve Berkowitz, 1979). Sonrasında yapılan bir başka çalışmada ise 14-haftalık STZ-diabetin ratlarda β -AR alttıpleri üzerindeki etkileri araştırılmış ve kardiyak β_1 -AR ekspresyonunun yaklaşık %55, kardiyak β_2 -AR ekspresyonunun ise yaklaşık %17 oranında azaldığı belirlenmiştir (Dincer ve ark., 2001). Buna ek olarak, 14-haftalık diabetik ratlarda gerçekleştirilen bir başka çalışmada da β_1 -AR-aracılı pozitif kronotropik yanıtların anlamlı olarak azaldığının gösterilmesi, diabette β -AR ekspresyonundaki azalmanın fonksiyonel yanıtlardaki azalmaya önemli ölçüde katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Dincer ve ark., 1998).

Öte yandan, yaklaşık 10 yıl önce kalpte β_3 -AR'lerin de bulunduğu gösterilmiş ve bunların fonksiyonel olduğu öne sürülmüştür (Gauthier ve ark., 1996). β_3 -AR'ler klasik β_1 - ve β_2 -AR'lerle karşılaştırıldığında molekül yapıları ve farmakolojik özellikleri açısından farklı bir profil çizerler. İlginç olarak, bu alttip, pozitif inotropik etkiye aracılık eden β_1 - ve β_2 -AR'lerin tersine negatif inotropik etkiye aracılık eder. Bu nedenle, β_3 -AR alttipinin kalp yetmezliğinin patogeneze katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Gerçekten de kalp yetmezliği ve kardiyak komplikasyonların sıklıkla gözlemlendiği diabet gibi patolojilerde β_3 -AR ekspresyonunun belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (Dincer ve ark., 2001; Moniotte ve ark., 2001). Ne var ki, diabette ekspresyonu artan β_3 -AR alttipinin aracılık ettiği negatif inotropik etkinin değişip değişmediğine yönelik bir araştırma henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu noktadan yola çıkarak, çalışmamızda β_3 -AR'lerin diabetin yol açtığı kardiyak değişimlere katkısının araştırılması amaçlanmıştır.

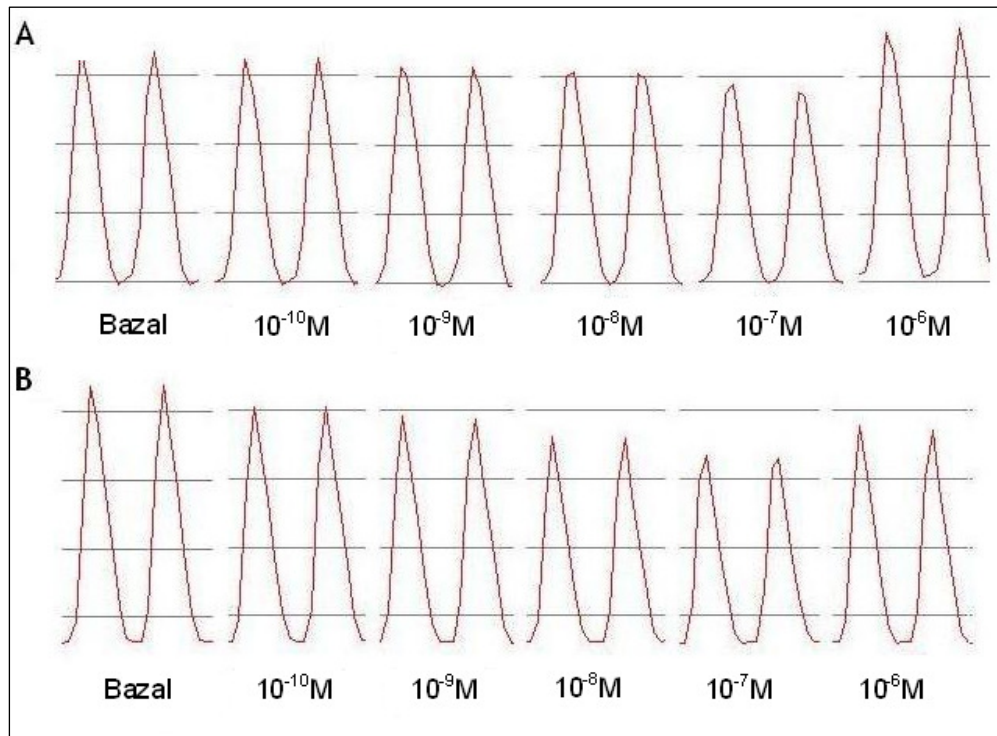
Çalışmamızda öncelikle 8 haftalık STZ-diabetin kardiyak disfonksiyona yol açıp açmadığının belirlenmesine yönelik olarak Millar kateter kullanılarak bazı bazal hemodinamik parametreler ölçülmüştür. Diabetik ratlarda LVP ve LVDP'nin anlamlı olarak azaldığı buna karşın, LVEDP'nin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Buna ek olarak, $+dP/dt$ ve $-dP/dt$ 'nin de belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir. Bulgularımız daha önceki araştırmaların sonuçlarıyla örtüşmektedir (Heyliger ve ark., 1985;

Ramanadham ve ark., 1989; Dai ve ark., 1994;). Elde ettiğimiz sonuçlar 8 haftalık diabetik ratlarda kardiyak performansın bozulduğunu göstermektedir. İnsulin tedavili diabetik ratlarda ise hemodinamik parametreler kontrol ratlardakinden farksız bulunmuştur. Bu da kardiyak performanstaki bozukluktan doğrudan diabetin sorumlu olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, diabetik ratların kalp atım hızının da kontrollerle karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldığı ve insulin tedavisi sonrasında kontrol düzeylere ulaştığı gözlenmiştir. Diabetik ratlarda gözlenen bradikardinin otonom sinir sistemi disfonksiyonuyla, bir başka anlatımla, vagal tonüsteki artışla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Jackson ve Carrier, 1983). Buna ek olarak, STZ ya da alloxan (ALL)'la diabet oluşturulmuş ratlarda hipotiroidizm gelişmektedir (Sundaresan ve ark., 1984). Tiroid hormonları kalpte adrenerjik reseptör ekspresyonunu etkilemekte ve hipotiroidili ratlarda β -AR dansitesi azalmaktadır (Sundaresan ve ark., 1984; Karasu ve ark., 1990). Bu noktadan yola çıkarak, çalışmamızda ölçülmemesine karşın diabetik ratlarda gelişen hipotiroidizmin β -AR ekspresyonunu azaltarak bradikardiye yol açtığını düşünmek mantıksal görünmektedir.

Öte yandan, araştırdığımız parametrelerden yalnızca sistolik ve diastolik kan basınçlarının 8 haftalık diabetten etkilenmediği belirlenmiştir. Diabetik ratlarda hem sistolik hem de diastolik kan basınçları çok küçük bir azalma göstermesine karşın sözü edilen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Özellikle tip 2 diabetiklerde olmak üzere diabetik hastalarda hipertansiyon prevalansının arttığı bilinmektedir (Sowers ve ark., 2001). Obez tip 2 diabetik hastaların yaklaşık %70'inin hipertansif oldukları kestirilmiştir (Williams B., 1999). Buna ek olarak, hipertansif hastaların yaklaşık %50'sinde de insulin rezistansı olduğu bildirilmiştir (Reaven GM, 1999). Hipertansiyon ve diabetin birlikte bulunması, doğal olarak kardiyovasküler komplikasyon riskinin belirgin olarak artmasına neden olmaktadır. İnsanlardan farklı olarak STZ-diabetik ratlarda genellikle hipotansiyon oluştuğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Maeda ve ark., 1995; Dall'Ago ve ark., 1997; Schaan ve ark., 1997). Az sayıdaki çalışmada ise hipertansiyon oluştuğu saptanmıştır (Kusaka ve ark., 1987; Goyal ve ark., 2008). Bu çelişkinin kan basıncı ölçüm yöntemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kan basıncını direkt yöntemle ölçen araştırmacılar genellikle hipotansiyon, indirekt yöntem kullanan araştırmacılar ise genellikle hipertansiyon oluştuğunu saptamışlardır (Schaan ve ark., 2004). Diabetik ratlarda gözlenen hipotansiyonun osmotik diürezisten kaynaklanan

hipovolemiye ya da kasılabilirliği azaltan myokard disfonksiyonuna bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (Hebden ve ark., 1986; DeAngelis ve ark., 2000). Öte yandan, spontan hipertansif diabetik ratlarda kronik hiperinsulineminin hipertansiyona yol açtığı gösterilmiştir (Brands ve ark., 1994). STZ-diabetik ratların karakteristiklerinden biri ise bilindiği gibi hipoinsulinemidir. Bu nedenle, çalışmamızda sistolik ve diastolik basınçların diabetik ratlarda kontrollere oranla hafifçe azalması şaşırtıcı değildir. Ne var ki, istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması büyük olasılıkla diabet süresinden kaynaklanmaktadır.

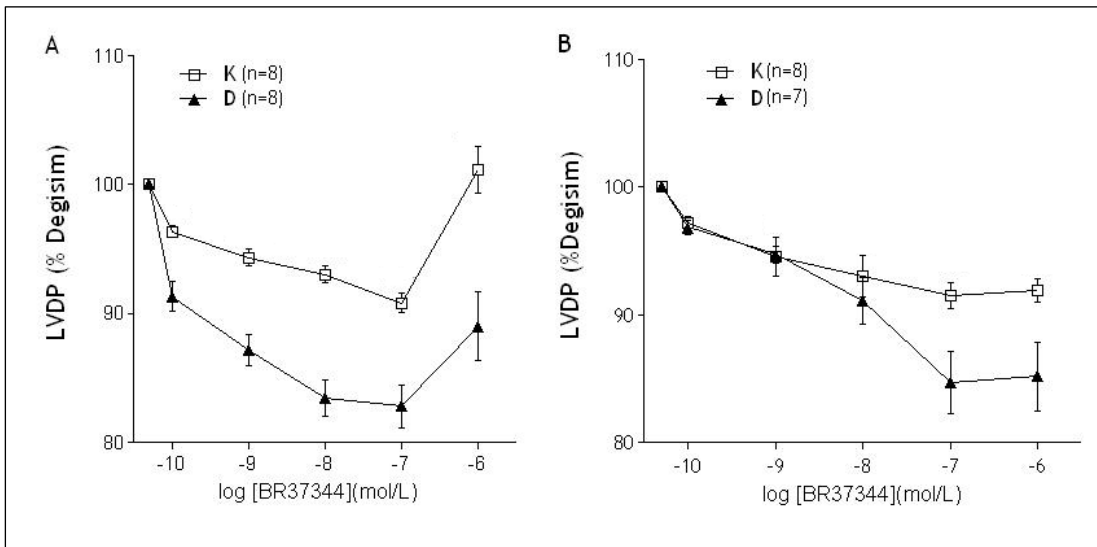


Şekil 4.1. BRL 37344'ün kontrol (A) ve diabetik (B) ratlarda negatif inotropik etkisine ilişkin konsantrasyon-yanıt eğrisi örneği

Çalışmamızın temel amacı kardiyak β_3 -AR stimülasyonunun diabette kardiyak performansın bozulmasına yaptığı olası katkının araştırılmasıdır. Bu amaca yönelik olarak, selektif β_3 -AR agonisti BRL 37344'ün LVDP, $+dP/dt$ ve $-dP/dt$ üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kalpte selektif β_3 -AR uyarısının negatif inotropik etkiye yol açtığı insan kardiyomyositlerinde gerçekleştirilen çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Gauthier ve ark.,1996). Benzer şekilde, ratlarda ve kobaylarda da kardiyak β_3 -AR- aracılı negatif inotropik etki saptanmıştır (Gauthier ve ark.,1999; Kitamura ve ark., 2000). Ancak, insan kalbinde β_3 -AR ekspresyonunun fazla olması nedeniyle bu

dokunun β_3 -AR uyarısına verdiği yanıtlar da doğal olarak fazladır. Bu nedenle, kalpte bu reseptör alttipinin aracılık ettiği fonksiyonel yanıtların niteliğinin belirlenebilmesi için kardiyak transplantasyon hastalarına yapılan endomyokardial biyopsi örneklerinden alınan kardiyomyositlerin kullanılması daha doğru bir yaklaşımdır. Ne var ki, benzer bir olanaktan yoksun olduğumuz için, çalışmamızda β -AR uyarısına yanıt verirliliği çok daha az olan kontrol ve diabetik ratlar kullanılmıştır. Öte yandan, *in vivo* çalışmalarda β_3 -AR agonistlerinin vazodilatör etkilerinden kaynaklanan barorefleks aktivasyonla ilişkili olarak ikincil pozitif kronotropik etkiye yol açtıkları da gösterilmiştir (Wheeldon ve ark., 1993; Berlan ve ark., 1994). Bu noktadan yola çıkarak, β_3 -AR uyarısına yanıt olarak gelişen periferik vazodilatasyonun inotropi üzerindeki yanıltıcı etkisinden sakınmak için çalışmamızda Langendorff perfüze kalp preparatları kullanılmıştır. β_3 -AR selektif agonisti BRL 37344 kontrol ratlarda LVDP değerlerini, bazal değerlerle karşılaştırıldığında, konsantrasyon-bağımlı bir biçimde azaltmış, bir başka anlatımla, negatif inotropik etki oluşturmuştur (Şekil 4.1). Ne var ki, BRL 37344'ün bu etkisi 10^{-10} - 10^{-7} mol/L konsantrasyon aralığında gözlenmiş, 10^{-6} mol/L konsantrasyona ulaşıldığında ise pozitif inotropik etkiye dönüşmüştür. Bulgularımız β_3 -AR agonistlerinin yüksek konsantrasyonlarda pozitif inotropik etki gösterdiğini bildiren çalışmalarla örtüşmektedir (Takayama ve ark., 1993; Wheeldon ve ark., 1993; Berlan ve ark., 1994). Sözü edilen pozitif inotropik etkinin, β_3 -AR agonistlerinin yüksek konsantrasyonlarda β_3 -AR yerine β_1 -/ β_2 -AR'leri etkilemesinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (Kitamura ve ark., 2000). Bu nedenle, hem β_1 -/ β_2 -AR-aracılı potansiyel etkileri ortadan kaldırmak hem de gözlediğimiz negatif inotropik etkinin β_3 -AR-aracılığıyla oluştuğunu doğrulamak için BRL 37344'ün etkileri β_1 -/ β_2 -AR antagonisti nadolol varlığında araştırılmıştır. BRL 37344'ün bu koşullarda da kardiyak kontraktilite üzerindeki inhibitör etkinliğinin değişmemesi, negatif inotropik etkinin β_3 -AR'ler aracılığıyla oluştuğunu göstermektedir. Öte yandan, BRL 37344'ün 10^{-6} M konsantrasyondaki pozitif inotropik etkinliğinin nadolol varlığında belirgin olarak baskılanması bu etkinin gerçekten β_1 -/ β_2 -ARler üzerinden oluştuğu yaklaşımını desteklemektedir (Şekil 4.2). Dahası, BRL 37344 ile uyarılan konsantrasyon-bağımlı negatif inotropik etkinin selektif β_3 -AR antagonisti SR 59230A ile ortadan kaldırılması, etkinin β_3 -AR-aracılı olduğuna ilişkin doğrudan bir kanıt olarak değerlendirilmelidir. Öte yandan, çalışmamızda BRL 37344'ün konsantrasyon-bağımlı negatif inotropik etkisinin diabetik ratlarda belirgin olarak arttığı bulunmuştur. Benzer şekilde, BRL 37344'ün sol ventrikül kontraktilitesinin

göstergeleri olan $+dP/dt$ ve $-dP/dt$ değerlerini de anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır. BRL 37344'ün lusitropik fonksiyonu azaltıcı bu etkinliği diabetik ratlarda belirgin olarak artmıştır. Literatürde β_3 -AR agonistlerinin lusitropik fonksiyon üzerindeki etkinliğine ilişkin çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Elde ettiğimiz bulgular BRL 37344'ün $+dP/dt$ ve $-dP/dt$ değerlerini azalttığını bildiren sonuçlarla uyum göstermektedir (Kitamura ve ark., 2000; Barbier ve ark., 2007). İnsulin tedavisi ise BRL 37344'ün diabetik ratlarda sol ventrikül kontraktilitesi üzerindeki etkinliğinin kontrol ratlardaki düzeylere dönmesini sağlamıştır.



Şekil 4.2. BRL 37344'ün nadolol yokluğunda (A) ve nadolol varlığında (B) elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri

Bulgilerimiz doğrultusunda çalışmamız, diabette kardiyak β_3 -AR-aracılı fonksiyonel yanıtlara ilişkin olarak gerçekleştirilen ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır. Bu anlamda “ilk” olmasına karşın β_3 -AR-aracılı negatif inotropik etkinin diabette arttığının bulunması, daha önceki çalışmalarımız gözönüne alındığında şaşırtıcı değildir. Laboratuvarımızda 14-haftalık diabetik ratlarda gerçekleştirilen önceki bir çalışmada kardiyak β_3 -AR mRNA ve protein ekspresyonlarının kontrol ratlara oranla yaklaşık 2 kat arttığı gözlenmiştir (Dincer ve ark., 2001). Benzer şekilde, 8 haftalık diabetik ratların kullanıldığı bu çalışmamızda da kardiyak β_3 -AR mRNA ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (Şekil 3.10). mRNA ekspresyonundaki bir artışın her koşulda protein ekspresyonuna aynen yansımaları beklemek doğru bir yaklaşım değildir. Yine de 14 haftalık diabetik ratlardaki protein ekspresyonu sonuçlarına dayanarak 8 haftalık diabette de kardiyak β_3 -AR protein

ekspresyonunun artma şansının yüksek olduğu düşünülmelidir. Bu noktadan yola çıkıldığında, BRL 37344'ün negatif inotropik etkisinde gözlediğimiz artış, büyük olasılıkla reseptör ekspresyonundaki artışla ilişkilidir. Kaldı ki, kardiyak β_3 -AR'lerin, β_1 -/ β_2 -AR'lerin tersine G_i ile kenetli oldukları gösterilmiştir (Gauthier ve ark., 1996). Kardiyomyositlerde BRL 37344'ün negatif inotropik etkisinin pertussis toksin (PTX) ile belirgin biçimde azaltılması, G_i proteinlerinin β_3 -AR sinyal yolağında yer aldığını düşündürmektedir (Gauthier ve ark., 1996). Kalp yetmezliğinde $G_{i\alpha 2}$ proteininin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Rozec ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda da diabetik ratlarda kardiyak $G_{i\alpha 2}$ ekspresyonunun arttığının belirlenmesi, diabette BRL 37344'ün fonksiyonel etkilerinde gözlenen değişimlerin β_3 -AR ve $G_{i\alpha 2}$ ekspresyonlarındaki değişimlerle ilişkili olabileceği görüşümüzü desteklemektedir.

Kalp yetmezliğinde myokard kontraktilesindeki azalmanın kompanse edilebilmesi için sempatik sinir sisteminin uyarıldığı bilinmektedir. Sempatik sinir sistemi aktivasyonu kasılabilirliği artırması nedeniyle kısa dönemde yararlı olmakta, ne var ki, sonrasında kalbin "preload" ve "postload"unu yüksek düzeyde tutmaya çalıştığından kalp için daha da zararlı olmaktadır. Gerçekten de dinlenme sırasında yetmezlikli kalpten salıverilen noradrenalin konsantrasyonlarının sağlıklı bir kalbe oranla yaklaşık 50 kat fazla olduğu saptanmıştır (Ganguly ve ark., 1987). Bunun doğal sonucu olarak plazma noradrenalin düzeylerinin kalp yetmezliğinde mortalitenin temel belirleyicisi olduğu düşünülmektedir (Altan ve ark., 2007). Öte yandan, yetmezlik sırasında artan sempatik sinir sistemi etkinliği bir süre sonra kardiyak β_1 -AR'lerde "downregulation"a, β_2 -AR'lerde ise desensitizasyona yol açarak aşırı etkinliğin myokarda tam olarak yansımaları engellemektedir. Bu nedenle, son yıllarda belirli kalp yetmezliği tiplerinin tedavisinde kalp üzerindeki sempatik sinir sistemi baskısının azaltılması amacıyla β -AR blokerleri kullanılmaya başlanmıştır. Bilindiği gibi sağlıklı bir kalbin kontraktilesi ve atım hızı β_1 - ve β_2 -ARler aracılığıyla düzenlenmektedir. Ancak, kalpte fonksiyonel β_3 -AR'ler de bulunmaktadır. Ne var ki, bu reseptörlerin β_1 -/ β_2 -AR'lerle birlikte kalpte bulunmalarının nedeni günümüzde bile sorgulanmaktadır. İlginç olarak, bu alttipin uyarılması negatif inotropik etki oluşturmaktadır. Bu bulgulara dayanarak, β_3 -ARlerin kalp yetmezliği gibi aşırı adrenerjik etkinliğin olduğu patolojilerde kalbi korumaya yönelik bir işlevi olduğunu düşünmek mantıksal görünmektedir. Öte yandan, diabet de süreç içinde myokard disfonksiyonuna kadar giden çok sayıda kardiyak komplikasyona yol açabildiğinden kalp yetmezliğinde β -AR'lerde oluşan değişimlerin diabette de ortaya çıkması olağandır. Çalışmamızda bazal hemodinamik

parametrelerde gözlediğimiz değişiklikler 8 haftalık diabetik ratlarda kardiyak disfonksiyon geliştiğini göstermektedir. Bu noktadan yola çıkıldığında, β_3 -AR-aracılı negatif inotropik etkinliğin diabette artması kalbi koruma amaçlı refleks bir mekanizma olarak görünmektedir. Ne var ki, yukarıda söz edildiği gibi kalp yetmezliği ve diabette β_1 -/ β_2 -AR-aracılı pozitif inotropik etkinliğin azalması, buna karşın β_3 -AR-aracılı negatif inotropik etkinliğin artması uzun dönemde bu patolojilerdeki myokard disfonksiyonunun daha da belirginleşmesine yol açmaktadır. Bir başka anlatımla, β_3 -AR'lerin sözü edilen patolojilerdeki koruma işlevinin, süreç içinde tam tersine malfonksiyona dönüştüğü düşünülmektedir (Altan ve ark., 2007; Gauthier ve ark., 2007). Çalışmamızda β_1 -/ β_2 -AR-aracılı pozitif inotropik etkiler araştırılmadığından bu yanıtlarda ortaya çıkacak olası azalmanın boyutu da bilinmemektedir. Bu nedenle, 8 haftalık diabetin β_3 -AR'lerin malfonksiyon göstermesi için yeterli bir süre olup olmadığını yorumlamak zordur. Daha sağlıklı bir yorum yapabilmek için β_1 -/ β_2 -AR ve β_3 -AR-aracılı yanıtlardaki değişimlerin daha uzun süreli diabetik ratlarda karşılaştırılmaları gerekmektedir.

Bunun yanısıra, insulin tedavisinden sonra BRL 37344'ün diabetik ratlardaki negatif inotropik etkisi kontrol ratlardan farksız bulunmuştur. Ne var ki, insulin tedavisi diabette artan β_3 -AR mRNA ekspresyonunun yeniden kontroller düzeyine dönmesini sağlayamamıştır. Bulgularımız ilk bakışta, insulinin diabetik ratlarda fonksiyonel yanıtları düzeltici etkinliğinin β_3 -AR'lerden bağımsız olarak oluştuğu izlenimini vermektedir. Ancak, insulinin diabetik ratlarda β_3 -AR mRNA ekspresyonu üzerinde etkisiz olması, β_3 -AR protein ekspresyonu üzerinde de bir etkisinin olmayacağı anlamını taşımamalıdır. Gerçekten de laboratuvarımızda daha önce yürütülen bir araştırmada insulin tedavisinin diabetik ratlarda β_2 - ve β_3 -AR protein ekspresyonlarını kontroller düzeyine indirmesine karşın β_2 -AR mRNA ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı, β_3 -AR mRNA ekspresyonunu ise kısmen düzelttiği gösterilmiştir (Dincer ve ark., 2001). Buna ek olarak, insulinin kalpte *in vitro* protein sentezini uyardığı, protein yıkımını ise azalttığı saptanmıştır (Rannels ve ark., 1975; Flain ve ark., 1983). Bu sonuçlar insulinin protein "turnover"ı üzerindeki etkinliğinin çok daha baskın olduğunu göstermektedir. Bu noktadan yola çıkıldığında, insulin tedavisinin diabetik ratlarda kardiyak β_3 -AR mRNA ekspresyonlarını değiştirmemesi şaşırtıcı görünmemektedir.

Öte yandan, insanlarda kardiyak β_3 -AR uyarısının NOS yolağı aracılığıyla myokard kontraktilitesini azalttığı gösterilmiştir (Gauthier ve ark., 1998). β_3 -AR agonistlerinin

negatif inotropik etkinliğinin NOS inhibitörleriyle inhibe edilmesi, β_3 -AR stimulasyonundan sonra kalpte NO üretiminin ve cGMP düzeylerinin arttığıının saptanması, buna ek olarak, immunohistokimyasal yöntemlerle insan endomyokardial biyopsilerinde eNOS ekspresyonunun arttığıının gösterilmesi bu yaklaşımın dayanağını oluşturmaktadır (Gauthier ve ark., 1998). Bu nedenle, çalışmamızda 8 haftalık diabetik ratların kardiyak eNOS ekspresyonu kontrol ratlarla karşılaştırılmış ve diabette eNOS ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Ne var ki, sözü edilen artış, beklentilerimizin dışında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bunun nedeni büyük bir olasılıkla örnek sayısının yeterli olmamasıdır (Şekil 3.12). Laboratuvarımızda dokuların saklandığı derin dondurucudaki bir sorun nedeniyle örneklerin bir bölümü kullanılamamıştır. Eğer yeterli örnek sayısına ulaşılabilseydi diabetik ratlarda eNOS ekspresyonunda gözlediğimiz artışın literatür verileri doğrultusunda istatistiksel olarak anlamlı bulunabileceğı olasılığı gözardı edilmemelidir.

Elde ettiğimiz bulgular kardiyak β_3 -AR stimulasyonunun kontrol ratlarda negatif inotropik etkiye yol açtığını ve bu etkinin 8 haftalık diabetik ratlarda belirgin olarak arttığını ortaya koymuştur. Bunun yanısıra, 8 haftalık diabetik ratlarda kardiyak β_3 -AR mRNA ekspresyonunun da arttığı saptanmıştır. Adipositlerde ve damarlarda bulunan β_3 -AR'lerin fonksiyonel rolü belirlenmiş olmasına karşın bu alttipe kalpte bulunmasının nedeni henüz anlaşılabilmiş değildir. Ne var ki, doğanın mantığı açısından bakıldığında β_3 -AR'lerin kardiyak yerleşim göstermesinin bir anlamı olmalıdır. β_3 -ARler, β_1 -/ β_2 -ARler için gerekenden çok daha yüksek katekolamin konsantrasyonlarında uyarılabilirler ve negatif inotropik etkiye aracılık ederler. Buna ek olarak, "downregulation"a dirençlidirler ve kalp yetmezliğı ile diabet gibi patolojilerde "upregule" olurlar. Bu özelliklerine dayanarak bu reseptör alttipeinin, yukarıda da belirtildiğı gibi sempatik sinir sistemi etkinliğinin aşırı arttığı durumlarda kardiyomyositlerin korunması amacıyla devreye sokulan bir koruyucu mekanizma olduğı düşünülmektedir. Kalp yetmezliğinde eskiden kontrindike olan β -blokerlerin artık klinikte kullanılmaya başlanmasının temel mantığı da budur. Sempatik sinir sistemi etkinliğindeki aşırı artışın myokarda progresif bir hasara neden olduğı ve bunun β -blokerle önlenmesinin bazı kalp yetmezliğı tiplerinde yararlı olduğı gösterilmiştir. Bu nedenle, β_3 -AR'lerin aslında kalp yetmezliğı tedavisinde β -blokerlerle sağlanmaya çalışılan etkiyi oluşturmak için kalpte yerleştiklerini düşünmek olanaklıdır. Son yıllarda üçüncü kuşak olarak adlandırılan vazodilatör etkili β -blokerler de hipertansiyon tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilaçların

karakteristiği β_1 -(nebivolol) ve β_1/β_2 -(busindolol) AR'leri bloke etmeleri ve β_3 -AR'leri ise uyarmalarıdır. Bir başka anlatımla, vazodilatör özellikleri β_3 -AR stimülasyonundan kaynaklanmaktadır. Benzer bir yaklaşımla, kardiyak β_3 -AR uyarısının da myokardiumda NO salıverilmesine yol açarak kalbin oksijen tüketimini azaltacağı ve kalp yetmezliğinin erken aşamalarında yararlı olabileceği öne sürülmüştür (Rozec ve ark., 2003). Ne var ki, kalp yetmezliğinin daha sonraki aşamalarında β_3 -AR-aracılı negatif inotropik etkinin myokard depresyonunu ağırlaştırması nedeniyle zararlı olabileceği düşünülmektedir (Rozec ve ark., 2003). Diyabet de yol açtığı kardiyak komplikasyonlar ve β -AR alttip ekspresyonlarındaki değişiklikler açısından kalp yetmezliğine benzerlik göstermektedir (Altan ve ark., 2007). Bu nedenle, kardiyak β_3 -AR'lerin diabetteki fonksiyonel rolünü aynı çerçevede düşünmek mantıksal görünmektedir. Hem deneysel (Paulson ve ark., 1980) hem de klinik (Christensen NJ., 1974) diabette plazma katekolamin düzeylerinin ve noradrenalinin kardiyak konsantrasyonlarının arttığı saptanmıştır. Bunun yanısıra, diabetik kardiyomyopatide noradrenalin "turnover"ı, "uptake"i, sentezi ve salıverilmesinin arttığı da saptanmıştır (Ganguly ve ark., 1986; Ganguly ve ark., 1987). Bir başka anlatımla, diabette de sempatik sinir sistemi aşırı etkinlik göstermektedir. Bu noktadan yola çıkarak, diabetik ratlarda saptadığımız kardiyak β -AR transkriptlerindeki ve β -AR-aracılı fonksiyonel yanıtlardaki artış, bir olasılıkla myokardı korumaya yönelik bir refleks mekanizma olarak tetiklenmektedir. Ne var ki, sempatik sinir sistemi aktivasyonuna bağlı olarak diabette β_1 -AR ekspresyonu azalmakta, β_2 -AR'lerde de desensitizasyon gelişmektedir. Bunun sonucunda da kardiyak performans bozulmaktadır (Altan ve ark., 2007). Zaten bozulmuş kardiyak performans üzerinde kronik β_3 -AR uyarısının daha da olumsuz etki yapması doğaldır. Bu nedenle, başlangıçta myokardı koruma mekanizması olarak uyarılan β_3 -AR'lerin hastalığın sonraki aşamalarında tam tersine myokard fonksiyonunu bozan bir mekanizmaya dönüşmesi de bir başka olasılıktır. Ancak, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda bu olasılıklardan hangisinin doğru olduğunu söyleme olanağımız bulunmamaktadır. Öte yandan, β_3 -AR'lerdeki moleküler varyasyonların obezite, insulin rezistansı ve tip 2 diabete yol açabileceği öne sürülmüştür (Rozec ve ark., 2006). β_3 -AR gen polimorfizminin tip 2 diabetik hastalarda proliferatif retinopati için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (Sakane ve ark., 1997). Kısa bir süre önce gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise β_3 -AR gen Trp64Arg mutasyonunun diabetle ilişkili olabileceğini gösteren bulgular elde

edilmiştir (Xiu ve ark., 2004). Bu sonuçlar, β_3 -AR'lerin diabetin yol açtığı kardiyovasküler komplikasyonların gelişiminde bir rol oynadığını düşündürmektedir.

β -AR alttipleri çok büyük bir olasılıkla farklı sinyal yollarını uyarmaktadırlar. β_1 -AR'lerin kardiyomyositlerde yalnızca G_s ile kenetlenmelerine karşın β_2 -ARlerin koşullara göre G_s ya da G_i ile kenetlenebilmeleri bu görüşü desteklemektedir (Kuschel ve ark., 1999). Gerçekten de kronik β_1 -AR stimülasyonunun kardiyomyositlerde apoptotik, β_2 -AR stimülasyonunun ise antiapoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir (Zhu ve ark., 2001; Chesley ve ark., 2000). Öte yandan, β_3 -AR'ler de G_i ile kenetlenirler ve NOS yolağını uyararak NO aracılığıyla kardiyak kontraktiliteyi azaltırlar. Bu noktadan yola çıkıldığında, spekülative bir yaklaşımla β_3 -AR'lerin antiapoptotik etki gösterebileceği ve böylece sempatik sinir sisteminin aşırı uyarıldığı durumlarda β_1 -AR-aracılı myokard hasarını baskılayabileceği düşünülebilir. Gerçekten de NO'nun antiapoptotik etki gösterdiğine ilişkin bulgular elde edilmiştir (Maejima ve ark., 2005; Li ve ark., 2006).

Sonuç olarak, araştırmamızda 8 haftalık diabetik ratlarda β_3 -AR'lerin negatif inotropik etkisinin arttığı saptanmıştır. Çalışmamız, bilgilerimiz doğrultusunda, diabette β_3 -AR-aracılı fonksiyonel yanıtların incelendiği ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır. Henüz bulgularımızın fizyolojik ya da fizyopatolojik önemi bilinmemektedir. Bu amaca yönelik olarak çok daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim bulunmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ratlarda kardiyak β_3 -AR'lerin uyarılması sonucu negatif inotropik etki oluştuğunu ve bu etkinin 8 haftalık diabetik ratlarda belirgin olarak arttığını ortaya koymuştur. 8 haftalık diabetik ratlarda sözü edilen artışa kardiyak β_3 -AR mRNA ekspresyonundaki artışın eşlik ettiği belirlenmiştir. Ne var ki, bu aşamada bulgularımızın fizyolojik ve/veya patolojik önemi açık değildir. Aslında kardiyak β_3 -AR'lerin fonksiyonel olduğu ve negatif inotropik etkiye aracılık ettiği bilinmektedir. Ancak, bu reseptör alttipinin sağlıklı bir kalpte bile kardiyak fonksiyonların düzenlenmesindeki rolü henüz anlaşılamamıştır. Bu amaç doğrultusunda, kardiyak β_3 -AR'lerin fonksiyonel rolünün aydınlatılmasına yönelik daha fazla sayıda araştırmaya gereksinim bulunmaktadır. Buna ek olarak, elde ettiğimiz sonuçların insanda da doğrulanması önemlidir. Kaldı ki, insan kalbinde β_3 -AR ekspresyonunun çok daha fazla olmasına paralel olarak β -AR agonistlerine verdiği yanıtlar da fazladır. Bu nedenle, β_3 -AR'lerin fonksiyonel etkisinin incelenmesi amacıyla kardiyak transplantasyon hastalarından alınan kardiyomyositler yaygın olarak kullanılmaktadır. Benzer bir olanaktan yoksun olmamız nedeniyle araştırmamız ratlarda gerçekleştirilmiştir. Gelecekte kalp nakli ameliyatlarının ülkemizde daha sık gerçekleştirilmesi durumunda bu olasılığın araştırılması gerekmektedir. Öte yandan, elde ettiğimiz bulguların yorumunun daha sağlıklı yapılabilmesi için değişik diabet sürelerinin kardiyak β_3 -AR fonksiyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması önem taşımaktadır.

ÖZET

Diabetin β_3 -AR-Aracılı Kardiyak Yanıtlar Üzerindeki Etkisi

β -adrenoseptörlerin β_1 -, β_2 - ve β_3 - alttiplerinin kardiyak dokularda bulunduğu gösterilmiş, buna karşın, bu alttiplerin fonksiyonel özelliklerinin ve uyardıkları sinyal yollarının farklı olduğu saptanmıştır. Kardiyak performansın düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynayan β_1 - ve β_2 -ARler pozitif kronotropik ve pozitif inotropik etkiye neden olurlar. Diabetik ratlarda kardiyak β_1 -AR ekspresyonundaki azalmaya fonksiyonel yanıtlardaki azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir. Öte yandan, kardiyak β_3 -AR'lerin stimülasyonu ise β_1 - ve β_2 -AR'lerin tersine negatif inotropik etkiye aracılık etmektedir. İlginç olarak, deneysel diabet ve kalp yetmezliğinde bu alttiplerin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Sözü edilen patolojilerde gözlenen kardiyak performanstaki azalmaya, β_3 -AR'lerin aracılık ettiği kardiyodepresan etkinin neden olduğu düşünülmektedir. Ne var ki, bu reseptör alttipinin kardiyak performansın düzenlenmesindeki fonksiyonel rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Buna ek olarak, bilgilerimiz doğrultusunda diabette kardiyak β_3 -AR-aracılı fonksiyonel yanıtlara ilişkin olarak gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda 8 haftalık diabetik ratlarda β_3 -AR stimülasyonunun kardiyak kontraktilite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, kardiyak yanıtverirlikte diabetin neden olduğu değişikliklerin insulin tedavisiyle düzelişip düzelmediği saptanmıştır. Kontrol ratlardan elde edilen izole kalp preparatlarında, selektif β_3 -AR agonisti BRL 37344'ün 10^{-10} - 10^{-7} mol/L konsantrasyon aralığında doz-bağımlı negatif inotropik etki oluşturduğu gözlenmiştir. BRL 37344 ile oluşan LVDP değerlerindeki azalmanın, bir başka anlatımla, negatif inotropik etkinin β_1 -/ β_2 -AR antagonisti nadolol varlığında değişmediği, β_3 -AR antagonisti SR 59230A varlığında ise tümüyle ortadan kalktığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, BRL 37344'ün aynı konsantrasyon aralığında $+dP/dt$ ve $-dP/dt$ değerlerini doz-bağımlı olarak azalttığı saptanmıştır. Bu parametrelerde gözlenen etkilerin de SR 59230A ile ortadan kaldırıldığı, nadolol ile değişmediği belirlenmiştir. Öte yandan, 8 haftalık diabetik ratların izole kalp preparatlarında BRL 37344'ün LVDP, $+dP/dt$ ve $-dP/dt$ üzerindeki etkilerinin kontrollere oranla anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Dahası, 8 haftalık diabette β_3 -AR mRNA ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, diabetik ratların kardiyak dokularında $G_{i\alpha 2}$ ve eNOS mRNA ekspresyonlarının da arttığı bulunmuştur. Diabetik ratlara uygulanan 2 haftalık insulin tedavisi sonucunda BRL 37344'ün kardiyak kontraktilite üzerindeki yanıtlarının kontroller düzeyine ulaştığı gözlenmiştir. Ne var ki, insulin tedavisi diabetik ratların β_3 -AR mRNA ekspresyonlarındaki artışı etkilememiştir. 8 haftalık diabetik ratlarda kardiyak β_3 -AR-aracılı fonksiyonel yanıtların ve mRNA ekspresyonlarının arttığını gösteren bulgularımızın fizyolojik ve/veya patolojik önemi açık değildir. Bu nedenle, kardiyak β_3 -AR'lerin sağlıklı ve yetmezlikli kalplerdeki rolünün aydınlatılabilmesi için ek çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: β_3 -Adrenoseptörler, diabet, $G_{i\alpha}$, kalp Yetmezliği, LVDP, negatif inotropi

SUMMARY

The Effect of Diabetes on β_3 -Adrenoceptor-Mediated Cardiac Responses

β -adrenoceptors of β_1 -, β_2 - and β_3 -subtypes have been shown to coexist in certain cardiac tissues, but the signalling pathways and functional properties of each subtype seem to be different. Since the stimulation of both β_1 - and β_2 -adrenoceptors causes positive inotropic and chronotropic effects, these subtypes are the primary means of improving cardiac performance. In accordance with the decreased functional responses, a decreased expression of cardiac β_1 -adrenoceptors from diabetic rats has been demonstrated. Stimulation of cardiac β_3 -adrenoceptors, on the other hand, mediate negative inotropic effect in contrast to classical β_1 - and β_2 -adrenoceptors. Interestingly, cardiac β_3 -adrenoceptors are upregulated in experimental diabetes and also in human heart failure. Thus, cardiodepressant effect mediated by β_3 -adrenoceptors has been proposed to contribute to the impaired cardiac function in these pathologies. However, the exact role of this subtype remains uncertain. Moreover, no data, to our knowledge are available on the effects of diabetes on cardiac β_3 -adrenoceptors-mediated functional responses. Therefore, in the present study we investigated the influence of 8-week diabetes on cardiac contractility to β_3 -adrenoceptors stimulation in rats. We also determined whether diabetes-induced alterations in cardiac responsiveness could be restored with insulin treatment. BRL 37344, a preferential β_3 -adrenoceptor agonist, induced a dose-dependent negative inotropic effect at concentrations ranging from 10^{-10} to 10^{-7} mol/L in isolated heart from control rats. The negative inotropic effect of BRL 37344 obtained by assessment of LVDP values was not modified by pre-treatment with nadolol, a β_1/β_2 -adrenoceptor antagonist, but abolished by SR 59230, a β_3 -adrenoceptor antagonist. Similarly, BRL 37344 also dose-dependently decreased $+dP/dt$ and $-dP/dt$ values at the same concentration range mentioned above. These effects of BRL 37344 were abolished by SR 59230 but not altered by nadolol pre-treatment. On the other hand, the effects of BRL 37344 on LVDP, $+dP/dt$ and $-dP/dt$ were all significantly increased in isolated hearts from 8-week diabetic rats. We also observed that 8-week diabetes significantly increased the mRNA levels encoding cardiac β_3 -adrenoceptors. In addition, eNOS and $G_{i\alpha 2}$ mRNA expressions were found to be increased in cardiac tissue of diabetic rats as well. Insulin treatment of diabetic rats for two weeks, completely restored BRL 37344 responses on cardiac contractility to near control values. Insulin treatment, however, did not reverse this increase in β_3 -adrenoceptors mRNA expression. The physiological and/or pathophysiological significance of our findings demonstrating an increase in both cardiac β_3 -adrenoceptors-mediated functional effects and mRNA expression in 8-week diabetic rats is not clear. Thus, further studies are required to elucidate the precise role of cardiac β_3 -adrenoceptors in health and disease.

Key Words: β_3 -Adrenoceptors, diabetes, $G_{i\alpha 2}$, heart failure, LVDP, negative inotropy

KAYNAKLAR

- ABE, T., OHGA, Y., TABAYASHI, N., KOBAYASHI, S., SAKATA, S., MISAWA, H., TSUJI, T., KOHZUKI, H., SUGA, H., TANIGUCHI, S., TAKAKI, M., (2002). Left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus model rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **282**:H138-148
- AHLES, A., ENGENHARDT, S., (2009). Polymorphisms determine β -adrenoceptor conformation: implications for cardiovascular disease and therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, **30**(4):188-193
- ALBERTI, K.G., ZIMMET, P.Z., (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.*, **15**: 539–553
- ALBERTO, J. KAUMANN, A.J., PREITNER, F., SARSERO, D., MOLENAAR, P., REVELLI, JP., GIACOBINO, J.P., (1998). (2)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative β_4 -adrenoceptors in both wild-type and β_3 -adrenoceptor knockout mice. *Molecular Pharmacology*, **53**:670–675
- ALMDAL, T., SCHARLING, H., JENSEN, JS., VESTERGAARD, H., (2004). The independent effect of type 2 diabetes mellitus on ischemic heart disease, stroke, and death: a population-based study of 13,000 men and women with 20 years of follow-up. *Arch Intern Med.*, **164**:1422-1426
- ALTAN, N., DINCEL, A., KOCA, C., (2006). Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, **31**(2):51–56.
- ALTAN, VM., (2003). The pharmacology of diabetic complications. *Current Medicinal Chemistry*, **10**:1317-1327
- ALTAN, VM., ARIOGLU, E., GUNER, S., OZCELIKAY, T., (2007). The influence of diabetes on cardiac β -adrenoceptor subtypes. *Heart Fail. Rev.*, **12**: 58-65
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2008). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, Vol 31, Suppl 1.
- AMOUR, J., LOYER, X., GUEN, M., MABROUK, N., DAVID, JS., CAMORS, E., CARUSIO, N., VIVIEN, B., ANDRIANTSITOHAINA, R., HEYMES, C., RIOU, B., (2007). Altered contractile response due to increased β_3 -adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anesthesiology*, **107**:452-60
- AMOUR, J., LOYER, X., MICHELET, P., BIRENBAUM, A., RIOU, B., HEYMES, C., (2008). Preservation of the positive lusitropic effect of β -adrenoceptors stimulation in diabetic cardiomyopathy. *Anest Analg.*, **107**:1130-8
- AN, D., RODRIGUES, B., (2006). Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **291**: H1489–H1506
- ANGELONE, T., FILICI, E., QUINTIERI, M., IMBROGNO, S., RECCHIA, A., PULERA, E., MANNARINA, C., PELLEGRINO, D., CERRA, M.C., (2008). β_3 -Adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway. *Acta Physiol.*, **193**(3):229-39

- ARCANGELIS, V., SOTO, D., XIANG, Y., ZHANG, J., (2009). Dynamic protein kinase A activities induced by β -adrenoceptors dictate signaling propagation for substrate phosphorylation and myocyte contraction. *Circ Res.*, Vol:104
- ARCH, J.R., (2001). The β_3 -adrenergic system and β_3 -adrenergic agonists. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, **2**:385-393
- ARCH, J.R., (2002). Beta 3 adrenoceptor agonists: potential, pitfalls, and progress. *Eur. J. Pharmacol.*, **440**(2-3):99-107.
- ARCH, J.R., AINSWORTH, A.T., CAWTHORNE, M.A., PIERCY, V., SENNITT, M.V., THODY, V.E., (1984). Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, **309**(5964):163–165
- ARCH, J.R., KAUMANN, A.J., (1993). Beta 3 and atypical beta adrenoceptors. *Med. Res. Rev.*, **13**(6):663-729.
- ARCH, J.R., WILSON, S. (1996). Beta 3-adrenoceptors and the regulation of metabolism in adipose tissues. *Biochem Soc Trans.*, **24**(2):412–418
- ARIOGLU, E., (2008). Hipotiroidizmin kardiyak performans üzerindeki etkisine beta 3 adrenoseptörlerin olası katkısı. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
- AVENDANO, GF., AGARWAL, RK., BASHEY, RI., LYONS, MM., SONI, BJ., JYOTHIRMAYI, GN., REGAN, TJ., (1998) Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. *Diabetes*, **48**:1443–1447
- BALLIGAND, JL., (2000). The β_3 -adrenoceptor: physiological role and potential therapeutic applications. *Acta Clinica Belgica*, **55**(4):209-14.
- BARBIER, J., MOUAS, C., RANNOU-BEKONO, F., CARRE, F., (2007). Existence of β_3 -adrenoceptors in rat heart: functional implications. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **34**:796–798
- BARBIER, J., RANNOU-BEKONO, F., MARCHAIS, J., TANGUY, S., CARRE, F., (2007). Alterations of β_3 -adrenoceptors expression and their myocardial functional effects in physiological model of chronic exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem.*, **300**:69-75
- BEAVO, J. A. (1995). cGMP inhibition of heart phosphodiesterase: is it clinically relevant? *J Clin Invest.*, **95**(2):445
- BECKMAN, JA., CREAGER, MA., LIBBY, P., (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, **287**:2570–2581
- BEGIN-HEICK, N. (1995). Beta 3-adrenergic activation of adenylyl cyclase in mouse white adipocytes: modulation by GTP and effect of obesity. *J Cell Biochem.*, **58**(4):464–473
- BELL, D.S.H., (2003). Diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care*, **26**(10):2949-2950
- BERG, TJ., SNORGAARD, O., FABER, J., TORJESEN, PA., HILDEBRANDT, P., MEHLSSEN, J., HANSEN KF., (1999) Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, **22**:1186 – 1190

- BERLAN, M., GALITZKY, J., BOUSQUET-MELOU, A., LAFONTAN, M., MONTASTRUC, J. L. (1994). Beta-3 adrenoceptor-mediated increase in cutaneous blood flow in the dog. *J Pharmacol Exp Ther.*, **268**(3):1444–1451
- BERS, D.M., (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, **415**:198-205
- BIANCHETTI, A., MANARA, L. (1990). In vitro inhibition of intestinal motility by phenylethanolaminotetralines: evidence of atypical beta-adrenoceptors in rat colon. *Br J Pharmacol.*, **100**(4):831–839
- BLIN, N., CAMOIN, L., MAIGRET, B., STROSBERG, A.D. (1993). Structural and conformational features determining selective signal transduction in the beta 3-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol.*, **44**(6):1094–1104
- BLOCH, W., BRIXIUS, K., BOLCK, B., GIACOBINA, J., GRAFWEG, S., JIMENEZ, M., SCHWINGER, R.H., WIESNER, R.J., ZISKOVEN, C., (2007). Increased Ca^{2+} sensitivity and protein expression of SERCA 2a in situations of chronic β_3 -adrenoceptor deficiency. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.*, **453**:443–453
- BLOCH, W., FLEISCHMANN, B.K., LORKE, D.E., ANDRESSEN, C., HOPS, B., HESCHELER, J., et al. (1999). Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.*, **43**(3):675–684
- BOND, R.A., CLARKE, D.E., (1988). Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the alpha- and beta-subtypes. *Br J Pharmacol.*, **95**(3):723–734
- BOOTH, J.V., LANDOLFO, K.P., CHESNUT, L.C., BENNETT-GUERRERO, E., GERHARDT, M.A., ATWELL, D.M. (1998). Acute depression of myocardial beta-adrenergic receptor signaling during cardiopulmonary bypass: impairment of the adenylyl cyclase moiety. Duke Heart Center Perioperative Desensitization Group. *Anesthesiology*, **89**(3):602–611
- BORGES, G.R., OLIVEIRA, M., SALGADO, H.C., FAZAN, R., (2006). Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*, **5**:26
- BOSCH, R.F., SCHNECK, A.C., KIEHN, J., ZHANG, W., HAMBROCK, A., EIGENBERGER, B.W., et al. (2002). Beta3-adrenergic regulation of an ion channel in the heart-inhibition of the slow delayed rectifier potassium current $I(\text{Ks})$ in guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.*, **56**(3):393–403
- BOUDINA, S., DALE ABEL, E., (2007). Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, **115**:3213-3223.
- BOULTON, A., AREZZO, J., BRIL, V., FELDMAN, E., FREEMAN, R., MALIK, R., MASER, R., SOSENKO, J., VINIK, A., ZIEGLER, D., (2005). Diabetic neuropathies. *Diabetes Care*, **28**:4
- BOYLE, P.J., (2007). Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *The American Journal of Medicine*, **120**:S12-17
- BRANDS, MW., GARRITY, CA., HOLMAN, MG., HALL, JE., (1994). Exaggerated pressor and chronotropic response to chronic hyperinsulinemia in SH versus WKY rats. *American Journal of Hypertension*, **7**: 75-81
- BRISTOW, M.R., (2000). β -Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*, **101**:558-569

- BRISTOW, MR., GINSBURG, R., UMANS, V., FOWLER, M., MINOBE, W., RASMUSSEN, R., ZERA, P., MENLOVE, R., SHAH, P., JAMIESON, S., (1986). Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor downregulation in heart failure. *Circ Res.*, **59**(3):297–309
- BRODDE, O.E., (2008). β_1 - and β_2 - adrenoceptor polymorphisms: Functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. *Pharmacology & Therapeutics*, **117**:1–29
- BRODDE, O.E., MICHEL, M.C., (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.*, **51**:651-90
- BRODDE, OE., BRUCK, H., LEINEWEBER, K., (2006). Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci.*, **100**:323-337
- BROWNLEE, M., (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**:813-820
- BUIJS, J., IVANICS, T., LIGETI, L., MIKLOS, Z., PRESTIA, C., RIEL, N.A, SZABO, C., SZENCZI, O., TOTTH, A., VUSSE, G., (2005). β -Adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes. *Life Sciences*, **76**:1083–1098
- BUSE, MG., (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **290**: E1–E8
- CALAGHAN, S., WHITE, E., (2006). Caveolae modulate excitation–contraction coupling and β_2 -adrenergic signalling in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, **69**:816 – 824
- CAMICI, P., CREA, F., (2007). Coronary Microvascular Dysfunction. *The New England Journal of Medicine*, **356**:830-40.
- CAMPBELL, D.L., STAMLER, J.S., STRAUSS, H.C. (1996). Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol.*, **108**(4):277–293
- CANDELORE, M.R., DENG, L., TOTA, L., GUAN, X.M., AMEND, A., LIU, Y., et al. (1999). Potent and selective human beta(3)-adrenergic receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.*, **290**(2):649–655
- CANDIDO, R., FORBES, J.M., THOMAS, M.C., THALLAS, V., DEAN, R.G., BURNS, W.C., TIKELLIS, C., RITCHIE, R.H., TWIGG, S.M., COOPER, M.E., BURRELL, L.M., (2003) A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes induced myocardial structural changes. *Circ Res*, **92**:785–792
- CESARIO, DA., BRAR, R., SHIVKUMAR, K., (2006). Alterations in ion channel physiology in diabetic cardiomyopathy. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, **35**:601– 610, ix-x
- CHAMBERLAIN, P.D., JENNINGS, K.H., PAUL, F., CORDELL, J., BERRY, A., HOLMES, S.D., et al. (1999). The tissue distribution of the human beta3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the beta3- adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, **23**(10):1057–1065
- CHAMPLAIN, J. (2001). Do most antihypertensive agents have a sympatholytic action? *Curr Hypertens Rep.*, **3**(4):305–313

- CHATHAM, JC., FORDER, JR., MCNEILL, JH. (1996). The heart in diabetes. *Norwell:Kluwer Academic Publishers*
- CHAUDHRY, A., MACKENZIE, R. G., GEORGIC, L.M., GRANNEMAN, J.G. (1994). Differential interaction of beta 1- and beta 3-adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes. *Cell Signal.*, **6**(4):457–465
- CHEN, J., RADFORD, M.J., WANG, Y., MARCINIAK, T.A., KRUMHOLZ, H.M. (2000). Are beta-blockers effective in elderly patients who undergo coronary revascularization after acute myocardial infarction? *Arch Intern Med.*, **160**(7), 947–952
- CHENG, H.J., ZHANG, Z.S., ONISHI, K., UKAI, T., SANE, D., CHENG, C.P. (2001). Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ Res.*, **89**(7):599–606
- CHESLEY, A., ASAI, T., CROW, M.T., LAKATTA, E.G., LUNDBERG, M.S., OHTANI, S., XIAO, R., (2000). The β_2 -Adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through Gi-dependent coupling to phosphatidylinositol 3*-kinase. *Circ Res.*, **87**:1172-1179
- CHOI, KM., ZHONG, Y., HOIT, BD., GRUPP, IL., HAHN, H., DILLY, KW., GUATIMOSIM, S., LEDERER, WJ., MATLIB, MA., (2002). Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **283**:H1398–H1408
- CHRIST, T., KAUMANN, A.J., RAVENS, U., THOMS, M., TOVARI, A.G., (2009). Inotropy and L-type Ca^{2+} current, activated by β_1 - and β_2 -adrenoceptors, are differently controlled by phosphodiesterases 3 and 4 in rat heart. *British Journal of Pharmacology*, **156**, 62–83
- CHRISTENSEN, NJ. (1974). Plasma norepinephrine and epinephrine in untreated diabetics, during fasting and after insulin administration. *Diabetes*, **23**:1-8
- CHRISTLIEB, AR., LONG, R., UNDERWOOD, RH., (1979). Renin-angiotensin-aldosterone system, electrolyte homeostasis and blood pressure in alloxan diabetes. *Am J Med Sci.*, **277**:295–303
- COLLINS, S., CAO, W., DANIEL, K.W., LUTTRELLI, L.M., ROCCA, G.J., SNEDDEN, S.K., SOEDER, K.J., (1999). The β_3 -Adrenergic Receptor Activates Mitogen-activated Protein Kinase in Adipocytes through a Gi-dependent Mechanism. *The Journal Of Biological Chemistry*, **274**:12017–12022
- COMMUNAL, C., COLUCCI, W.S., SAWYER, D.B., SINGH, K., (1999). Opposing effects of β_1 - and β_2 -Adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation*, **100**:2210-2212
- CONRATH, C., OPTHOF, T., (2002). β_3 -adrenoceptors in the heart. *Cardiovascular Research*, **56**:353-356
- COSSON, S., KEVORKIAN, JP., (2003). Left ventricular diastolic dysfunction: an early sign of diabetic cardiomyopathy? *Diabetes Metab.*, **29**:455-66
- CRAVEN, P.A., STUDER, R.K., DERUBERTIS, F.R., (1994). Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest.*, **93**:311-320
- DAI, S., FRASER, H., YUEN, VG., MCNEILL JH., (1994). Improvement in cardiac function in streptozotocin-diabetic rats by salt loading. *Can J Physiol Pharmacol.*, **72**: 1288-1293

- DALL'AGO, P., FERNANDES, TG., MACHADO, UF., BELLÓ, AA., IRIGOYEN, MC. (1997). Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocindabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **30**:119-124
- DE ANGELIS, KLD., OLIVEIRA, AR., DALL'AGO, P., PEIXOTO, LRA., GADONSKY, G., LACCHINI, S., FERNANDES, TG., IRIGOYEN, MC., (2000). Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocindabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**: 635-641
- DESSY, C., MONIOTTE, S., GHISDAL, P., HAVAU, X., NOIRHOMME, P., BALLIGAND, JL., (2004). Endothelial β_3 -adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation*, **110**:948-954
- DESSY, C., SALIEZ, J., GHISDAL, P., DANEAU, G., LOBYSHEVA, I., FRERART, F., et al. (2005). Endothelial β_3 -adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation β -blocker nebivolol. *Circulation*, **112**(8):1198–1205
- DEVEREUX, R.B., ROMAN, M.J., PARANÍCAS, M., O'GRADY, MJ., LEE, E.T., WELTY, T.K., FABSITZ, R.R., ROBBINS, D., RHOADES, E.R., HOWARD, B.V., (2000) Impact of diabetes on cardiac structure and function: the Strong Heart Study. *Circulation*, **101**:2271–2276
- DEVIC, E., XIANG, Y., GOULD, D., KOBILKA, B., (2001). β -adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from β_1 and β_2 adrenoceptor knockout mice. *Molecular Pharmacology*, **60**:577-583
- DINCER, D., ONAY, A., ARI, N., OZCELIKAY, T., ALTAN, VM., (1998). The effects of diabetes on β -adrenoceptor mediated responsiveness of human and rat atria. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **40**:113-122
- DINCER, U.D., BIDASEE, K.D., GUNER, S., TAY, A., OZCELIKAY, A.T., ALTAN, V.M., (2001). The effect of diabetes on expression of β_1 , β_2 , β_3 - adrenoceptors in rat hearts. *Diabetes*, **50**(2):455-461.
- DOGGRELL, S.A., SURMAN, A.J. (1995). Loss of maximum attenuation and receptor reserve for isoprenaline at the β_2 -adrenoceptors of the portal veins of hypertensive rats. *J Hypertens* **13**(9):1023–1029
- DOLAN, J.A., MUENKEL, H.A., BURNS, M.G., PELLEGRINO, S., FRASER, C., PIETRI, F., et al. (1994). β_3 -adrenoceptor selectivity of the dioxolane dicarboxylate phenethanolamines. *J Pharmacol Exp Ther.*, **269**(3):1000–1006
- DONCKIER, J.E., MASSART, P.E., VAN MECHELEN, H., HEYNDRIKX, G.R., GAUTHIER, C., BALLIGAND, J.L. (2001). Cardiovascular effects of β_3 -adrenoceptor stimulation in perinephritic hypertension. *Eur J Clin Invest.*, **31**(8):681–689
- DZIMIRI, N., (1999). Regulation of β -adrenoceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacological Reviews*, **51**:3
- ECKEL, J., REINAUER, H., (1990). Insulin action on glucose transport in isolated cardiac myocytes: signalling pathways and diabete-induced atreations. *Biochem Soc Trans.*, **18**:1125-1127
- EISENBARTH, GS., (2007). Update in Type 1 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **92**:2403-2407

- EISENBARTH, GS., DEVENDRA, D., LIU, E., (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*, **328**:750-4
- EISNE, D.A., TRAFFORD, A.W. (2002). Heart failure and the ryanodine receptor does occam's razor rule? *Circ. Res.*, **91**:979-981
- EMORINE, L., BLIN, N., STROSBURG, A.D. (1994). The human beta 3- adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci.*, **15**(1):3-7
- EMORINE, L.J., MARULLO, S., BRIEND-SUTREN, M.M., PATEY, G., TATE, K., DELAVIER-KLUTCHKO, C., (1989). Molecular characterization of the human beta 3 adrenergic receptor. *Science*, **245**(4922):1118-1121.
- ESCHENHAGEN, T., HEUBACH, J.F., KAUMANN, A.J., RAU, T., RAVENS, U. , (2002). Physiological antagonism between ventricular β_1 -adrenoceptors and α_1 -adrenoceptors but no evidence for β_2 - and β_3 -adrenoceptor function in murine heart. *British Journal of Pharmacology*, **136**:217-229
- FARKOUH, ME., ANEJA, A., BANSILAL, S., GARCIA, MJ., WILSON, TANG, WH., (2008). Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. *The American Journal of Medicine*, **121**:748-757
- FELDMAN, R.D. (1987). Beta-adrenergic receptor alterations in hypertension—physiological and molecular correlates. *Can J Physiol Pharmacol.*, **65**(8):1666-1672
- FIORDALISO, F., LI, B., LATINI, R., SONNENBLICK, EH., ANVERSA, P., LERI, A., KAJSTURA, J., (2000). Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II-dependent. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.*, **80**:513-527
- FISHER, M., (2004). Diabetes and atherogenesis. *Heart*, **90**:336-340
- FLAIN, KE., KOCHER, PC., KIRA, Y., KOBAYASHI, K., FOSSEL, ET., JEFFERSON LS., MORGAN, HE., (1983). Insulin effects on protein synthesis are independent of glucose and energy metabolism. *Am J Physiol.*, **245**:C133-143
- FORREST, R.H., HICKFORD, J.G., (2000). Rapid communication: nucleotide sequences of the bovine, caprine, and ovine beta3-adrenergic receptor genes. *J Anim Sci.*, **78**(5):1397-1398
- FOWLER, MJ., (2008). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes*, Volume **26**:77-82
- FREIRE, CMV., MOURA, MT., BARBOSA, M., MACHADO, LJ., NOGUEIRA, A., RIBEIRO-OLIVEIRA, A., (2007). Left ventricle diastolic dysfunction in diabetes: an update. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **51**/2:168-175
- FRIEDMAN, M., WANG, S.Y., STAHL, G.L., JOHNSON, R.G., SELLKE, F.W. (1995). Altered beta-adrenergic and cholinergic pulmonary vascular responses after total cardiopulmonary bypass. *J Appl Physiol.*, **79**(6)
- FRUSTACI, A., KAJSTURA, J., CHIMENTI, C., JAKONIUK, I., LERI, A., MASERI, A., NADALGINARD, B., ANVERSA, P., (2000). Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res.*, **87**:1123-1132
- GALITZKY, J., REVERTE, M., PORTILLO, M., CARPENE, C., LAFONTAN, M., BERLAN, M. (1993). Coexistence of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenoceptors in dog fat cells and their differential activation by catecholamines. *Am J Physiol.*, **264**(3 Pt 1):E403-E412

- GALLEG0, M., ESPINA, L., & CASIS, O. (2002). Blood pressure responsiveness to sympathetic agonists in anaesthetised diabetic rats. *J Physiol Biochem.*, **58**(2):87–93
- GAN, R., LI, W., XIU, C., SHEN, J., WANG, X., WU, S., KONG, Y., (2007). Chronic blocking of β_3 -adrenoceptors ameliorates cardiac function in rat model of heart failure. *Chin Med J.*, **120**(24):2250-2255
- GANGULY, PK., BEAMISH, RE., DHALLA, KS., INNES, IR., DHALLA, NS., (1987). Norepinephrine storage, distribution and release in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol.*, **252**:E734-E739
- GANGULY, PK., DHALLA, KS., INNES, IR., BEAMISH, RE., DHALLA, NS., (1986). Altered norepinephrine storage, distribution, and release in diabetic cardiomyopathy. *Circ Res.*, **59**:684-693
- GANDO, S., AKAISHI, Y., HATTORI, Y., KANNO, M., NISHIHARA, J., (1997). Impaired contractile response to beta adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in beta adrenoceptors-G Protein-adenylate cyclase system and phospholamban phosphorylation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **282**:475–484
- GAUTHIER, C., LANGIN, D., BALLIGAND, JL., (2000). Beta 3 adrenoceptors in the cardiovascular system. *TIPS*, **21**:1562-5.
- GAUTHIER, C., LEBLAIS, V., KOBZIK, L., TROCHU, J.N., KHANDOUDI, N., BRIL, A., (1998). The negative inotropic effects of beta 3 adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.*, **102**(7):1377-1384.
- GAUTHIER, C., ROZEC, B., NOIREAUD, J., TROCKU, JN., (2003). Place of β_3 -adrenoceptors among other β -adrenoceptor subtypes in the regulation of the cardiovascular system. *Arch Mal Coeur Vaiss.*, **96**(9):905-13.
- GAUTHIER, C., SEZE-GOISMIER, C., ROZEC, B., (2007). Beta 3-adrenoceptors in te cardiovascular system. *Clinical Hemorheology and microcirculation*, **37**:193-204
- GAUTHIER, C., TAVERNIER, G., CHARPENTIER, F., LANGIN, D., LE MAREC, H., (1996). Functional beta 3 adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.*, **98**(2):556-562.
- GAUTHIER, C., TAVERNIER, G., TROCHU, J.N., LEBLAIS, V., LAURENT, K., LANGIN, D., (1999). Interspecies differences in cardiac negative inotropic effects of β_3 -adrenoceptor agonists. *JPET.*, **290**(2):687-693.
- GERHANDSTEIN, BL., PURI, TS., CHIEN, AJ., HOSEY, MM. (1999) Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the b2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*, **38**:10361–10370
- GERHARDT, C.C., GROS, J., STROSBERG, A.D., ISSAD, T. (1999). Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ pathway by human *beta*-3 adrenergic receptor: new pharmacological profile and mechanism of activation. *Molecular Pharmacology*, **55**:255–262
- GERMACK, R., DICKENSON, J.M. (2006). Induction of {beta}3-adrenergic receptor functional expression following chronic stimulation with noradrenaline in neonatal rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther.*, **316**(1):392–402
- GILLESPIE, K.M., (2006)., Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ*, **175**(2):165-70
- GOLDHABER, J.I., KIM, K.H., NATTERSON, P.D., LAWRENCE, T., YANG, P., WEISS, J.N. (1996). Effects of TNF-alpha on $[Ca^{2+}]$ and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol.*, **271**(4 Pt 2):H1449–H1455.

- GOODMAN AND GILMAN'S The Pharmacological Basis of Therapeutics, (2001). Tenth edition. McGraw-Hill Medical Publishing Division. U.S.A.
- GOSGNACH, W., BOIXEL, C., NEVO, N., POIRAUD, T., MICHEL, J.B. (2001). Nebivolol induces calcium-independent signaling in endothelial cells by a possible beta-adrenergic pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **38**(2):191–199
- GOYAL, BR., MESARIYA P., GOYAL RK., MEHTA A., (2004). Effect of telmisartan on cardiovascular complications associated with streptozotocin diabetic rats. *Mol Cell Biochem.*, **314**:123–131
- GRANNEMAN, J.G., (2001). The putative β_4 -adrenergic receptor is a novel state of the β_1 -adrenergic receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **43**: E199–E202
- GROOT, A.A., MATHY, M.J., ZWIETEN, A., PETERS, S. L. (2003). Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **42**(2):232–236
- GROSS, J., AZEVEDO, M., CANANI, L., CARAMORI, M.L., SILVEIRO, S., ZELMANOVITZ, T., (2005). Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*, **28**:176–188
- GROSS, W.L., BAK, M.I., INGWALL, J.S., ARSTALL, M.A., SMITH, T.W., BALLIGAND, J.L., et al. (1996). Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **93**(11):5604–5609
- GUYTON&HALL, (2001). Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, onuncu baskı. Bölüm 78
- HACETTEPE İÇ HASTALIKLARI DERS KİTABI, (2004). Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- HALLER, M.J., GOTTLIEB, P.A., DESMOND, S.A., (2007). Type 1 diabetes intervention trials 2007: where are we and where are we going? *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, **14**:283–287
- HARE, JM., GIVERTZ, M., CREAGER, M., COLUCCI, WS., (1998). Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure. *Circulation*, **97**:161-166
- HEAD, BP., PATEL, HH., ROTH, DM., LAI, NC., NIESMAN, IR., FARQUHAR, MG., INSEL, PA., (2005). G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*, **280**:35
- HEBDEN, RA., GARDINER, SM., BENNETT, T., MACDONALD, IA., (1986). The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clinical Science*, **70**: 111-117
- HEYLIGER C.E. , PIERCE G. N. , SINGAL P. K. , BEAMISH R. E. , DHALLA N. S., (1982). Cardiac alpha- and beta-adrenergic receptor alterations in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* **77**:610-618
- HEYLIGER, C.E., TAHILIANI, AG., MCNEILL, JH., (1985). Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*, **227**:1474-1477
- HICKS, K.K., SEIFEN, E., STIMERS, J.R., KENNEDY, R.H., (1998). Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control. *Journal of the Autonomic Nervous System*, **69**:21–30

- HIRAMATSU, Y., SEKIGUCHI, N., HAYASHI, M., ISSHIKI, K., YOKOTA, T., KING, G.L., LOEKEN, M.R., (2002). Diacylglycerol production and protein kinase C activity are increased in a mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetes*, **51**:2804–2810
- HOWARTH, F.C., JACOBSON, M., SHAFIULLAH, M., ADEGHATE, E., (2006). Effects of insulin treatment on heart rhythm, body temperature and physical activity in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **33**:327–331
- HUTCHINSON, D.S., BENGTSSON, T., EVANS, B.A., SUMMERS, R.J. (2002). Mouse beta 3a- and beta 3b-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *Br J Pharmacol.*, **135**(8):1903–1914
- IMBROGNO, S., ANGELONE, T., ADAMO, C., PULERA, E., TOTA, B., CERRA, M.C., (2006). Beta3-adrenoceptor in the eel heart: negative inotropy and NO-cGMP-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Biology*, **209**:4966-4973
- ISHII, H., JIROUSEK, M.R., KOYA, D., TAKAGI, C., XIA, P., CLERMONT, A., BURSELL, S., KERN, T., BALLAS, L.M., HEATH, W.F., STRAMM, L.E., FEENER, E.P., KING, G.L. (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science*, **272**:728-731
- IWASE, M., ICHIKAWA, K., TASHIRO, K., IINO, K., SHINOHARA, N., IBAYASHI, S., et al. (2000). Effects of monosodium glutamate-induced obesity in spontaneously hypertensive rats vs. Wistar Kyoto rats: serum leptin and blood flow to brown adipose tissue. *Hypertens Res.*, **23**(5):503–510
- JOHNSTONE, M.T., CREAGER, S.J., SCALES, K.M., CUSCO, J.A., LEE, B.K., CREAGER, M.A., (1993). Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*, **88**(6):2510-2516.
- JONES, L.R., BESCH, H.R., FLEMING, J.W., MCCONNAUGHEY, M.M., WATANABE, A.M., (1979). Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum. Comparative biochemical analysis of component activities. *JBC*, **254**,(2):530-539
- JOSEPH, S.S., LYNHAM, J.A., MOLENAAR, P., GRACE, A.A., COLLEDGE, W.H., KAUMANN, A.J. (2003). Intrinsic sympathomimetic activity of (–)-pindolol mediated through a (–)-propranolol-resistant site of the beta1-adrenoceptor in human atrium and recombinant receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **368**(6):496–503
- KANNEL, W.B., MCGEE, D.L., (1979). Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*, **59**:8-13
- KARASU, C., ALTAN, V.M., (1993). The role of endothelial cells on the alterations in vascular reactivity induced by insulin-dependent diabetes mellitus: effects of insulin treatment. *Gen Pharmacol.*, **24**(3):743-55
- KARASU, C., OZTURK, Y., ALTAN, N., ARI, N., IKIZLER, C., ALTAN, V.M., (1990). Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *Gen Pharmac.*, **21**:735-740
- KASS, D., CHAKIR, K., DAYA, S.K., XIAO, R., TORNASELLI, G., ZHU, W., PACAK, K., LAI, E., JACQUES, K., AIBA, T., TUNIN, R., DIMAANO, V., ABRAHAM, T., (2009). Mechanisms of enhanced β -adrenergic reserve from cardiac resynchronization therapy. *Circulation*, **119**:1231-1240.
- KATHOFER, S., ZHANG, W., KARLE, C., THOMAS, D., SCHOELS, W., KIEHN, J. (2000). Functional coupling of human beta 3-adrenoreceptors to the KvLQT1/MinK potassium channel. *J Biol Chem*, **275**(35):26743–26747

- KATZUNG, B.G., (2001). Basic And Clinical Pharmacology, eight edition. Lange medical Books/Mc Graw-Hill, Medical Publishing Division, U.S.A.
- KAUMANN, A.J., (1989) Is there a third heart beta-adrenoceptor? *Trends. Pharmacol. Sci.* **10**:316-320.
- KAUMANN, A.J., (1997). Four beta adrenoceptor subtype in the mammalian heart. *TIPS*, **18**:70-76.
- KAUMANN, A.J., BARTEL S., MOLENAAR P., SANDERS L., BURRELL K., VETTER D., HEMPEL P., (1999). Activation of beta 2 adrenergic receptors hastens relaxation and mediates phosphorylation of phospholamban, troponin I, and C protein in ventricular myocardium from patients with terminal heart failure. *Circulation*, **99**: 65-72.
- KAUMANN, A.J., MOLENAAR, P., (1996). Differences between the third cardiac β_3 -adrenoceptor and the colonic β_3 -adrenoceptor in the rat. *British Journal of Pharmacology*, **118**, 2085-2098
- KAUMANN, A.J., MOLENAAR, P., (1997). Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **355**:667–681
- KAUMANN, A.J., SANDERS L., LYNHAM JA., BARTEL S., KUSCHEL M., KARCZEWSKI P., KRAUSE EG., (1996). Beta 2 adrenoceptor activation by zinterol causes protein phosphorylation, contractile effects and relaxant effects through a cAMP pathway in human atrium. *Mol. Cell. Biochem.*, **163-164**:113-123.
- KAUMANN, AJ., ENGELHARDT, S., HEIN, L., MOLENAAR, P., LOHSE, M., (2001) Abolition of (–) CGP 12177-evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptors for putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **363**:87–93
- KAUMANN, AJ., MOLENAAR, P., CHEN, L., SEMMLER, ABT., PARSONAGE, WA., (2007). Human heart β -adrenoceptors: β_1 -adrenoceptor diversification through 'affinity states' and polymorphism. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **34**:1020-1028
- KAWASUJI, M., TEDORIYA, T., TAKEMURA, H., SAKAKIBARA, N., TAKI, J., WATANABE, Y. (1993). Flow capacities of arterial grafts for coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.*, **56**(4):957–962
- KAYAALP, S.O. (2002). Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, onuncu baskı.
- KEYS, J.R., KOCH W.J., (2004). The adrenergic pathway and heart failure. *Recent Progress in Hormone Research* **59**:13-30
- KITAMURA, T., ONISHI, K., DOHI, K., OKINAKA, T., ISAKA, N., NAKANO, T., (2000). The negative inotropic effect of beta 3 adrenoceptor stimulation in the beating guinea pig heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **35**(5):786-790.
- KIZILTAN, M.E., (1997). Diabet ve periferik nöropati. *Diabetes Mellitus Sempozyumu*, 18 - 19 Aralık 1997, s. 69-77
- KOHOUT, T.A., TAKAOKA, H., MCDONALD, P.H., PERRY, S.J., MAO, L., LEFKOWITZ, R.J., (2001). Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta 3 adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation*, **104**(20):2485-2491.
- KOIKE, K., TAKAYANAGI, I., MURAMATSU, M., OHKI, S., HORINOUCHE, T., (1994) Involvement of beta 3-adrenoceptor in the relaxation response in guinea pig taenia caecum. *Jpn J Pharmacol.*, **66**(2):213–220

- KONG, Y.H., LI, W.M., TIAN, Y. (2004). Effect of beta3-adrenoreceptors agonist on beta3-adrenoreceptors expression and myocyte apoptosis in a rat model of heart failure. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, **16**(3):142–147
- KORZICK, D.H., (2003). Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update. *Adv Physiol Educ.*, **27**:192–200.
- KUBO, S., MATSUDA, A., OHNUKI, T., HATTORI, K., SUZUKI, J., NAGATOMO, T. (1997). Assessment of beta 2- and beta 3-adrenoceptors in rat white adipose tissues by radioligand binding assay. *Biol Pharm Bull.*, **20**(2):142–148
- KUPERSHMIT, S., YANG, T., ANDERSON, M.E., WESSELS, A., NISWENDER, K.D., MAGNUSON, M.A., et al. (1999). Replacement by homologous recombination of the mink gene with lacZ reveals restriction of mink expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res.*, **84**(2):146–152
- KUSAKA, M., KISHI K., SOKABE, H. (1987). Does so-called streptozotocin (STZ) hypertension exist in rats? *Hypertension*, **10**: 517-521
- KUSCHEL, M., ZHOU Y., SPURGEON H.A., BARTEL S., KARCZEWSKI P., SHENG-JUN ZHANG S., KRAUSE E., LAKATTA E.G., XIAO R., (1999). Beta 2 adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart. *Circulation*, **99**:2458-2465
- LANDS, A.M, ARNOLD, A., McAULIFF, J.P., LUDUENA, F.P., BROWN, T.G., (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 214(88): 597-598.
- LANGIN, D., PORTILLO, M.P., SAULNIER-BLACHE, J.S., LAFONTAN, M. (1991). Coexistence of three beta-adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur J Pharmacol.*, **199**(3):291–301
- LATIFPOUR, J., MCNEILL, JH., (1984). Cardiac autonomic receptors: effect of long-term experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.*, **230**(1):242-9.
- LAVER, DR., (2007). Ca^{2+} stores regulate ryanodine receptor Ca^{2+} release channels via luminal and cytosolic Ca^{2+} sites. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **34**: 889–896
- LEBLAIS, V., DEMOLOMBE, S., VALLETTE, G., LANGIN, D., BARO, I., ESCANDE, D., et al. (1999). Beta3-adrenoceptor control the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol Chem.*, **274**(10), 6107–6113
- LEFKOWITZ, R.J., (2006). Seven transmembrane receptors—a brief personal retrospective. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1768**:748–755
- LEFKOWITZ, R.J., CARON, M.G., JONES, L.R., LAVIN, T.N., STILES, G.L., STRASSER, R.H., (1983). The Cardiac β -Adrenergic Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**:8443-8449.
- LEHTO, S., RONNEMAA, T., PYORALA, K., LAAKSO, M., (1996) Predictors of stroke in middle-aged patients with non-insulin-dependent diabetes. *Stroke*, **27**:63–68
- LENZEN, G., PIETRI-ROUXEL, F., DRUMARE, M.F., AMIARD, A., GUILLOT, S., ARCHIMBAULT, P., et al. (1998). Genomic cloning and species-specific properties of the recombinant canine beta3-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol.*, **363**(2–3):217–227
- LERNMARK, A., (1999). Type 1 Diabetes. *Clinical Chemistry* **45**:8(B) 1331–1338

- LEROY, J., ABI-GERGES, A., CONTI, M., FISCHMEISTER, R., LECHENE, P., MAZET, JL., NIKOLAEV, V.O., RICHTER, W., VANDECASTEELE, G., (2008). Spatiotemporal dynamics of β -Adrenergic cAMP signals and L-Type Ca^{2+} channel regulation in adult rat ventricular myocytes. *Circ. Res.*, **102**:1091-1100
- LEVESQUE, P.C., HART, P.J., HUME, J.R., KENYON, J.L., HOROWITZ, B. (1992). Expression of cystic fibrosis transmembrane regulator Cl^- channels in heart. *Circ Res.*, **71**(4):1002-1007
- LI, D., TAO, L., LIU, H., CHRISTOPHER, TA., LOPEZ, BL., MA XL., (2006). Role of ERK1/2 in the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis*, **11**: 923-930
- LIEDTKE, AJ., DEMAISON, L., EGGLESTON, AM. et al., (1988). Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. *Circ Res.*, **62**:535-542
- LIGGETT, S.B. (1992). Functional properties of the rat and human beta 3- adrenergic receptors: differential agonist activation of recombinant receptors in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol.*, **42**(4):634-637.
- LIGGETT, S.B., FREEDMAN, N.J., SCHWINN, D.A., LEFKOWITZ, R.J. (1993). Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic RECEPTOR. *PROC NATL ACAD SCI USA*, **90**(8):3665-3669.
- LIM, HS., MACFADYEN, RJ., LIP, G., (2004). Diabetes Mellitus, the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, and the Heart. *Arch Intern Med.*, **164**:1737-1748
- LONNQVIST, F., AMER, P., EMORINE, L.J., KRIEF, S., NYBERG, B., STROSBERG, D., (1993). Evidence for a functional β_3 -adrenoceptor in man. *Br. J. Pharmacol.*, **110**:929-936
- LOWELL, BB., SPIEGELMAN, BM., (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, **404**:652-660
- LYMPEROPOULOS, A., RENGU, G., KOCH, W.J., (2007). Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation. *Trends in Molecular Medicine*, Vol.**13** No.12
- MAEDA, CY., FERNANDES, TG., TIMM, HB., IRIGOYEN, MC., (1995). Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension*, **26**:1000-1004
- MAEJIMA, Y., ADACHI, S., MORIKAWA, K., ITO, H., ISOBE M., (2005). Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **38**:163-174
- MAFFEI, A., PADO, A., CARANGI, R., CARULLO, P., POULET, R., GENTILE, M., VECCHIONE, C., LEMBO, G., (2007). Nebivolol induces nitric oxide release in the heart through inducible nitric oxide synthase activation. *Hypertension*, **50**:652-656
- MAIER, L.S., BERS, D.M., (2007). Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovascular Research*, **73**: 631-640
- MALHOTRA, A., SANGHI, V., (1997). Regulation of contractile proteins in diabetic heart. *Cardiovasc Res.*, **34**:34-40
- MALINOWSKA, B., SCHLICKER, E., (1997). Further evidence for differences between cardiac atypical β -adrenoceptors and brown adipose tissue β_3 -adrenoceptors in the pithed rat. *British Journal of Pharmacology*, **122**:1307 $\pm$ 1314

- MALLEM, M.Y., TOUMANIANTZ, G., SERPILLON, S., GAUTIER, F., GOGNY, M., DESFONTIS, J., et al. (2004). Impairment of the low-affinity state beta1- adrenoceptor-induced relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.*, **143**(5):599–605
- MANARA, L., BADONE, D., BARONI, M., BOCCARDI, G., CECCHI, R., CROCI, T., GIUDICE, A., GUZZI, U., LANDI, M., FUR, G., (1996). Functional identification of rat atypical β_3 -adrenoceptors by the first β_3 -selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. *British Journal of Pharmacology*, **117**:435-442
- MARTIN, CA., ADVENIER, C., (1995). Beta 3-adrenoceptors and airways. *Fundam Clin Pharmacol.*, **9**(2):114–118
- MARX, SO., REIKEN, S., HISAMATSU, Y., JAYARAMAN, T., BURKHOFF, D., ROSEMBLIT, N., MARKS, AR., (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor) defective regulation in failing hearts. *Cell*, **101**:365–376
- MATSUDA N., AKAISHI Y., GANDO S., HATTORI Y., KANNO M., KEMMOTSU O., (1999). Diabetes-induced downregulation of β_1 -Adrenoceptor mRNA expression in rat heart. *Biochemical Pharmacology*, Vol. **58**:881–885
- MATTER, C.M., MANDINOV, L., KAUFMANN, P.A., VASSALLI, G., JIANG, Z., HESS, O.M. (1999). Effect of NO donors on LV diastolic function in patients with severe pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, **99**(18):2396–2401
- MCNEILL, J.H., SHARMA, V., ALLARD, M.F., BROWNSEY, R., DHILLON, P., PARSONS, H., WAMBOLT, R., (2008). Metoprolol improves cardiac function and modulates cardiac metabolism in the streptozotocin-diabetic rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **294**:H1609–H1620
- MCNEILL, J.H., ALLARD, M.F., PARSONS, H., SHARMA, V., (2008). Metoprolol increases the expression of β_3 -adrenoceptors in the diabetic heart: Effects on nitric oxide signaling and forkhead transcription factor-3. *European Journal of Pharmacology*, **595**:44–51
- MERY, P.F., LOHMANN, S.M., WALTER, U., FISCHMEISTER, R. (1991). Ca^{2+} current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **88**(4), 1197–1201
- MICHEL, M.C., ALEWIJNSE, A.E., VRYDAG, W., (2009). Do gene polymorphisms alone or in combination affect the function of human β_3 -adrenoceptors? *British Journal of Pharmacology*, **156**, 127–134
- MICHEL, M.C., VRYDAG, W., (2007). Tools to study β_3 -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **374**:385–398
- MICHEL, MC., BRODDE, O.E., INSEL, PA., (1990). Peripheral adrenergic receptors in hypertension. *Hypertension*, **16**(2), 107–120
- MILANO, C.A., ALLEN, L.F., ROCKMAN, H.A., DOLBER, P.C., MCMINN, T.R., CHIEN, K.R., et al. (1994). Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science*, **264**(5158), 582–586
- MOFFETT, S., MOUILLAC, B., BONIN, H., BOUVIER, M. (1993). Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J.*, **12**(1), 349–356
- MONIOTTE, S., BALIIGAND, JL., (2003). The β_3 -adrenoceptor and its regulation in cardiac tissue. *Intensivmed.*, **40**:484-493

- MONIOTTE, S., BALLIGAND, J.L., (2002). Potential use of β_3 -adrenoceptor antagonists in heart failure therapy. *Cardiovascular Drug Reviews*, **20**:19-26
- MONIOTTE, S., KOBZIK, L., FERON, O., TROCHU, J.N., GAUTHIER, C., BALLIGAND, J.L., (2001). Upregulation of β_3 -Adrenoceptors and Altered Contractile Response to Inotropic Amines in Human Failing Myocardium. *Circulation*, **103**:1649-1655
- MONIOTTE, S., VAERMAN, J.L., KOCKX, M.M., LARROUY, D., LANGIN, D., NOIRHOMME, P., et al. (2001). Real-time RT-PCR for the detection of betaadrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol.*, **33**(12):2121–2133
- MONTE, F., ARDING, S.E., KAUMANN, A.J., PEPPER, J., POOLE-WILSON, P.A., WYNNE, D.G., (1993). Coexistence of functioning β_1 - and β_2 -adrenoceptors in single myocytes from human ventricle. *Circulation*, **88**:854-863
- MORIMOTO, A., HASEGAWA, H., CHENG, H.J., LITTLE, W., CHENG, C.P. (2004). Endogenous beta3-adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **286**(6), H2425–H2433
- NATIONAL DIABETES FACT SHEET, (2007). Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention.
- NEUMANN, J., (2006). The cardiac β -adrenoceptors: where and why? *Cardiovascular Research*, **71**:6–7
- NODARI, S., METRA, M., DEI, C.L. (2003). Beta-blocker treatment of patients with diastolic heart failure and arterial hypertension. A prospective, randomized, comparison of the long-term effects of atenolol vs. nebivolol. *Eur J Heart Fail.*, **5**(5):621–627
- OZAKCA, I., (2005). Streptozotosin-diyabetik sıçan izole gastrik fundus preparatında β -adrenerjik reseptör yanıtlarındaki olası değişiklikler. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
- OZTURK, Y., ALTAN, VM, YILDIZOGLU-ARI, N., (1996). Effects of experimental diabetes and inulin on smooth muscle functions. *Pharmacological Reviews*, **48**:69-112
- OZUARI, A., OZTURK, Y., YILDIZOGLU-ARI, N., OZCELIKAY, AT., ALTAN, VM., (1993). The effects of glyburide and insulin on the cardiac performance in rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Gen Pharmacol.*, **24**(1):165-9.
- PANG, Y., BOUNELIS, P., CHATHAM, J.C., MARCHASE, R.B., (2004). Hexosamine pathway is responsible for inhibition by diabetes of phenylephrine-induced inotropy. *Diabetes*, **53**:1074–1081
- PARIKH, P., POORNIMA, I.G., SHANNON, R.P., (2006). Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ. Res.*, **98**:596-605
- PAULSON, D.J., SHETLAR, D., LIGHT KE., (1980). Catecholamine levels in the heart, serum and adrenals of experimental diabetic rats. *Fed Proc.*, **39**:637
- PELAT, M., GALITZKY, J., LAFONTAN, M., MONTASTRUC, J.L., SENARD, J.M., VERWAERDE, P., (2003). High isoproterenol doses are required to activate β_3 -adrenoceptor-mediated functions in dogs. *The Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **304**:1
- PIESKE, B., WACHTER, R., (2008). Impact of diabetes and hypertension on the heart. *Current Opinion in Cardiology*, **23**:340–349

- PIETRI-ROUXEL, F., STROSBURG, A. D. (1995). Pharmacological characteristics and species-related variations of beta 3-adrenergic receptors. *Fundam Clin Pharmacol.*, **9**(3):211–218
- PINHAS-HAMIEL, O., ZEITLER, P., (2007). Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Lancet*, **369**:1823–31
- PLUTZKY, J., (2007). A cardiologist's perspective on cardiometabolic risk. *The American Journal of Cardiology*, **100**[suppl]:3P–6P
- PONTI, F., COSENTINO, M., COSTA, A., CREMA, A., D'ANGELO, L., FRIGO, G., GIBELLI, G., GIRANI, M., (1995). Inhibitory effects of SR 58611A on canine colonic motility: evidence for a role of β_3 -adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology* **114**:1447-1453
- POORNIMA, I.G., PARIKH, P., SHANNON, R.P., (2006). Diabetic cardiomyopathy the search for a unifying hypothesis. *Circ. Res.*, **98**:596-605
- POTT, C., BLOCH, W., BRIXIUS, K., NAPP, A., SCHWINGER, H.G.R., STEINRITZ, D., (2006). Zur funktion des beta 3 adrenozeptors am herzen: signaltransduktion, inotroper effekt und therapeutischer ausblick. *Wien. Med. Wochenschr.*, **156**(15-16):451-458.
- POTT, C., BRIXIUS, K., BUNDKIRCHEN, A., BOLCK, B., BLOCH, W., STEINRITZ, D., MEHLHORN, U., SCHWINGER, RH., (2003). The preferential β_3 -adrenoceptor agonist BRL 37344 increases force via β_1 -/ β_2 - adrenoceptors and induces endothelial nitric oxide synthase via β_3 -adrenoceptors in human atrial myocardium. *British Journal of Pharmacology*, **138**:521-529
- RAMANADHAM, S., MONGOLD, JJ., BROWNSEY, RW., CROS GH., MCNEILL JH., (1989). Oral vanadyl sulfate in treatment of diabetes mellitus in rats. *Am J Physiol.*, **257**:904-911
- RANNELS, DE., KAO, R., MORGAN, HE., (1975). Effect of insulin on protein turnover in heart muscle. *J Biol Chem.*, **250**:1694-1701
- REAVEN GM., (1999). Intensive blood pressure/glucose control in type 2 diabetes: why is it so difficult to decrease coronary heart disease? *J Hum Hypertens.*, **13**:19-S-23.
- REED, G., CEFARATTI, C., BERTI-MATTERA, L.N., ROMANI, A., (2008). Lack of insulin impairs Mg^{2+} homeostasis and transport in cardiac cells of streptozotocin-injected diabetic rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, **104**:1034–1053
- RETNAKARAN, R., ZINMAN, B., (2008). Type 1 diabetes, hyperglycaemia, and the heart. *Lancet*, **371**:1790-99
- RIORDAN, J.R., ROMMENS, J.M., KEREM, B., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**(4922):1066–1073
- ROCKMAN, H.A., KOCH, W.J., LEFKOWITZ, R.J., (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, **415**:206-212.
- ROUGET, C., BREUILLER-FOUCHE, M., MERCIER, F.J., LEROY, M.J., LOUSTALOT, C., NALINE, E. et al. (2004). The human near-term myometrial beta 3- adrenoceptor but not the beta 2-adrenoceptor is resistant to desensitisation after sustained agonist stimulation. *Br J Pharmacol.*, **141**(5), 831–841
- ROZEC, B., ERFANIAN, M., LAURENT K., TROCHU JN., GAUTHIER C., (2009). Nebivolol, a Vasodilating Selective β_1 -Blocker, Is a β_3 -Adrenoceptor Agonist in the Nonfailing Transplanted Human Heart. *Journal of the American College of Cardiology*, **53**:17

- ROZEC, B., GAUTHIER, C., (2006). Beta 3 adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacology and therapeutics*, **111**(3):652-73.
- RUDDY, T., SHUMAK, S., LIU, P., BARNIE, A., SEAWRIGHT, S., MCLAUGHLIN, R., ZINMAN B., (1988) The relationship of cardiac diastolic dysfunction to concurrent hormonal and metabolic status in type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.*, **66**:113-8
- RYALL, J.G., SCHERTZER, J.D, MURPHY, K.T., ALLEN, A.M., LYNCH, G.S., (2008). Chronic β_2 -adrenoceptor stimulation impairs cardiac relaxation via reduced SR Ca^{2+} -ATPase protein and activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **294**: H2587–H2595
- SAKANE, N., YOSHIDA, T., YOSHIOKA, K., NAKAMURA, Y., UMEKAWA, T., KOGURE, A., et al. (1997). Beta 3-adrenoreceptor gene polymorphism: a newly identified risk factor for proliferative retinopathy in NIDDM patients. *Diabetes*, **46**(10):1633–1636
- SAVARESE, J., BERKOWITZ, BA., (1979). β -adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. *Life Sciences* **25**: 2075–2078
- SCHAAN, BD., DALL'AGO, P., MAEDA, CY., FERLIN, E., FERNANDES, TG., SCHMID, H., IRIGOYEN, MC., (2004). Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res.*, **37**:12
- SCHAAN, BD., MAEDA, CY., TIMM, H., MEDEIROS, S., MORAES, R., FERLIN, E., FERNANDES, TG., RIBEIRO, JP., SCHMID, H., IRIGOYEN, MC. (1997). Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **30**:1081-1086
- SCHARFMANN, R., ATTALI, M., DUVILLIE, B., FILHOULAUD, G., GUILLEMAIN, G., STETSYUK, V., (2008). β -cell development: the role of intercellular signals. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **10** (Suppl. 4):195–200
- SCHÖNAUER, M., MORBACH, S., NIEBAUER, J., SCHÖNAUER, U., THIEL, H., THOMAS, A., (2008). Cardiac autonomic diabetic neuropathy. *Diabetes Vasc Dis Res.*, **5**:336–44
- SCHRANZ, D., DROEGE, A., BROEDE, A., BRODERMANN, G., SCHAFER, E., OELERT, H., et al. (1993). Uncoupling of human cardiac beta-adrenoceptors during cardiopulmonary bypass with cardioplegic cardiac arrest. *Circulation*, **87**(2):422–426
- SCHULZ, R., RASSAF, T., MASSION, P.B., KELM, M., BALLIGAND, J.L. (2006). Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther.*, **108**(3), 225–256
- SELLERS, DJ., CHESS-WILLIAMS, R., (2001). The effect of streptozotocin-induced diabetes on cardiac β -adrenoceptor subtypes in the rat. *Journal of Autonomic Pharmacology*, **21**:15-21
- SELLKE, F.W., TOFUKUJI, M., STAMLER, A., LI, J., WANG, S.Y. (1997). Beta adrenergic regulation of the cerebral microcirculation after hypothermic cardiopulmonary bypass. *Circulation*, **96**(9 Suppl), II-10
- SEVERSON, DL., (2004). Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol.*, **82**:813-23
- SHAH, A.M., LAKATTA, E.G., SOLLOTT, S.J., (1998). Physio-pharmacological evaluation of myocardial performance: an integrative approach. *Cardiovascular Research*, **39**:148–154

- SHAH, A.M., SPURGEON, H.A., SOLLOTT, S.J., TALO, A., LAKATTA, E.G. (1994). 8- Bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca^{2+} in intact cardiac myocytes. *Circ Res.*, **74**(5), 970–978
- SHARMA, V., MCNEILL, JH., (2005). Diabetic cardiomyopathy: Where are we 40 years later? *Can J Cardiol.*, Vol 22, No 4
- SHEN, Y.T., CERVONI, P., CLAUS, T., VATNER, S.F., (1996). Differences in beta 3 adrenoceptor cardiovascular regulations in conscious primates, rats, and dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**(3):1435-1443.
- SHEN, Y.T., ZHANG, H., VATNER, S.F. (1994). Peripheral vascular effects of beta-3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther.*, **268**(1), 466–473
- SHIVALKAR, B., DHONDT, D., GOOVAERTS, I., GAAL, L., BARTUNEK, J., CROMBRUGGE, P., VRINTS, C., (2006). Flow Mediated Dilatation and Cardiac Function in Type 1 Diabetes Mellitus. *The American Journal of Cardiology*, **97**:77-82
- SIBLEY, D.R., LEFKOWITZ, R.J., (1985). Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature*, **317**:124-129.
- SIMMERMAN, HK., JONES, LR., (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action and role in cardiac function. *Physiol Rev.*, **78**:921–947
- SKEBERDIS, VA., (2004). Structure and function of β_3 -adrenergic receptors. *Medicina (Kaunas)*, **40**(5):407-413
- SOEDER, KJ., SNEDDEN, SK., CAO, W., DELLA ROCCA, GJ., DANIEL, KW., LUTTRELL, LM., COLLINS, S., (1999). The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *J Biol Chem.*, **274**(17):12017-22
- SOLANG L., MALMBERG K, RYDEN L., (1999). Diabetes mellitus and congestive heart failure. Further knowledge needed. *European Heart Journal*, **20**:789–795
- SOWERS, J.R., EPSTEIN, M., FROHLICH, E. (2001). Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease : an update. *Hypertension*, **37**:1053-1059
- SPIEGL, G., CSIK, G., CSONKA, D., FALKAY, G., MINORICS, R., ZUPKO, I., (2009). Effects of experimentally induced diabetes mellitus on pharmacologically and electrically elicited myometrial contractility. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*
- STANGL, K., CASCORBI, I., LAULE, M., STANGL, V., MEISEL, C., WERNECKE, K.D. (2001). The beta3-adrenergic receptor Trp64Arg mutation is not associated with coronary artery disease. *Metabolism*, **50**(2), 184–188
- STEINBERG, SF., (1999) The molecular basis for distinct β -adrenoceptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res.*, **85**:1101–1111
- STERIN-BORDA, L., BERNABEO, G., GANZINELLI, S., JOENSEN, L., BORDA, E., (2006). Role of nitric oxide/cyclic GMP and cyclic AMP in β_3 adrenoceptor-chronotropic response. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **40**:580–588
- STROSBERG, A.D, (1997). Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **37**:421–50

- STROSBERG, A.D., PIETRI-ROUXEL, F., (1996). Function and the regulation of the beta 3 adrenoceptor. *Trends. Pharm. Sci.*, **17**(10):373-381.
- SULAKHE, PV., VO, XT. (1995) Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli. *Mol Cell Biochem.*, 149–**150**:103–126
- SUMMERS, R.J., KOMPA, A., ROBERTS, S.J., (1997). Beta-adrenoceptor subtypes and their desensitization mechanisms. *J Auton Pharmacol.*, **17**(6):331–343
- SUNDARESAN, PR., SHARMA, VK., GINGOLD, SL., BANERJEE, PS., (1984). Decreased beta-adrenergic receptors in rat heart in streptozotocin-induced diabetes: role of thyroid hormones. *Endocrinology*, **114**:1358-1363
- SUSULIC, V.S., FLIER, J.S., FREDERICH, R.C., HAGEN, JH., HARPER, ME., KAHN, B.B, LAWITTS, J., LOWELL, B.B., TOZZO, E., (1995) Targeted disruption of the β_3 -adrenergic receptor gene. *The Journal Of Biological Chemistry*, **270**:9483–29492
- SWAN, JW., WALTON, C., GODSLAND, IF., CLARK, AL., COATS, AJ., OLIVER, MF., (1994). Insulin resistance in chronic heart failure. *Eur Heart J.*, **15**(11):1528-32.
- SZABO, C., (2002). PARP as a drug target for the therapy of diabetic cardiovascular dysfunction. *Drug News Perspect*, **15**:197–205
- TAKAYAMA, S., FURUKAWA, Y., REN, L.M., INOUE, Y., SAWAKI, S., CHIBA, S. (1993). Positive chronotropic and inotropic responses to BRL 37344, a beta 3-adrenoceptor agonist in isolated, blood-perfused dog atria. *Eur J Pharmacol.*, **231**(3):315–321
- TAMADA, A., HATTORI, Y., HOUZEN, H., YAMADA, Y., SAKUMA, I., KITABATAKE, A., KANNO, M., (1998). Effects of β -adrenoceptor stimulation on contractility, $[Ca^{+2}]_i$, and Ca^{+2} current in diabetic rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **274**:1849-1857
- TAVERNIER, G., GALITZKY, J., BOUSQUET-MELOU, A., MONTASTRUC, J. L., BERLAN, M. (1992). The positive chronotropic effect induced by BRL 37344 and CGP 12177, two beta-3 adrenergic agonists, does not involve cardiac beta adrenoceptors but baroreflex mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.*, **263**(3):1083–1090
- TAVERNIER, G., TOUMANIANTZ, G., ERFANIAN, M., HEYMANN, MF., LAURENT, K., LANGIN, D., GAUTHIER, C., (2003). β_3 -adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human β_3 -adrenergic receptor. *Cardiovascular Research*, **59**:288-296
- TAY, A., (2006). Deneysel diabetin ratlarda beta 3 adrenoseptörler üzerindeki etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- TODA, N. (2003). Vasodilating beta-adrenoceptor blockers as cardiovascular therapeutics. *Pharmacol Ther.*, **100**(3), 215–234
- TORRES, J., DARLEY-USMAR, V., WILSON, M.T. (1995). Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *Biochem J.*, **312**(Pt 1), 169–173
- TUGRUL, A., (2002). Diyabetik Nefropati. T.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, **19**(2):113-121
- TURNER, N.C., WHITE, P. (1996). Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinaemic obese Zucker rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **27**(6), 884–890

- VADLAMUDI, RV., MCNEILL, JH., (1984). Effect of experimental diabetes on isolated rat heart responsiveness to isoproterenol. *Can J Physiol Pharmacol.*, **62**(1):124-31.
- VARGHESE, P., HARRISON, RW., LOFTHOUSE, RA., GEORGAKOPOULOS, D., BERKOWITZ, DE., HARE, JM., (2000). β_3 -adrenoceptor deficiency blocks nitric-oxide dependent inhibition of myocardial contractility. *J.Clin. Invest.*, **106**:697-703
- WAHLER, G. M., DOLLINGER, S.J. (1995). Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol.*, **268**(1 Pt 1), C45–C54
- WAKASAKI, H., KOYA, D., SCHOEN, FJ., JIROUSEK, M.R., WAYS, D.K., HOIT B.D., WALSH, R.A., KING, G.L., (1997). Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci. U S A*, **94**:9320–9325
- WALSTON, J., LOWE, A., SILVER, K., YANG, Y., BODKIN, N.L., HANSEN, B. C., et al. (1997). The beta3-adrenergic receptor in the obesity and diabetes prone rhesus monkey is very similar to human and contains arginine at codon 64. *Gene*, **188**(2):207–213
- WANG, J., IKEDA, T., MARUI, A., MATSUOKA, S., MURANAKA, H., NISHINA, T., TSUKASHITA, M., YOSHIKAWA, E., (2008). Chronic partial unloading restores β -adrenergic responsiveness and reverses receptor downregulation in failing rat hearts. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **137**:2
- WANG, Q., CURRAN, M.E., SPLAWSKI, I., BURN, T.C., MILLHOLLAND, J.M., VANRAAY, T.J., et al. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet.*, **12**(1):17–23
- WARNE, T., BAKER, J., EDWARDS, P., HENDERSON, R., LESLIE, A.G., MOUKHAMETZIANOV, R., SCHERTLER, G.F., SERRANO-VEGA, M.J., TATE, C.G., (2008). Structure of a β_1 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **454**:486-491
- WARTH, J.D., COLLIER, M.L., HART, P., GEARY, Y., GELBAND, C.H., CHAPMAN, T., et al. (1996). CFTR chloride channels in human and simian heart. *Cardiovasc Res.*, **31**(4):615–624
- WERSTIUK, E.S., LEE, R.M. (2000). Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol.*, **78**(6):433–452
- WHEELDON, NM., MCDEVITT, DG., LIPWORTH, BJ., (1993). Investigation of putative cardiac β_3 -adrenoceptors in man. *Q. J. Med.*, **86**:255-61
- WILLIAMS, B., (1999). The unique vulnerability of diabetic subjects to hypertensive injury. *J Hum Hypertens.*, **13**:S3-S8.
- WILSON, C., LINCOLN, C., (1984). β -Adrenoceptor subtypes in human, rat, guinea pig and rabbit atria. *J Cardiovasc Pharmac.*, **6**:1216–1221
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation.
- XIA, Z., KUO, K., NAGAREDDY, P., WANG, F., GUO, Z., GUO, T., JIANG, J., MCNEILL, J., (2007). N-acetylcysteine attenuates PKC β 2 overexpression and myocardial hypertrophy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular Research*, **73**:770-782

- XIAO, R.P., HOHL, C., ALTSCHULD, R., JONES, L., LIVINGSTON, B., ZIMAN, B., TANTINI, B., LAKATTA, E.G., (1994). Beta 2 adrenergic receptor stimulated increase in cAMP in the rat heart cells is not coupled to changes in Ca^{++} dynamics, contractility or phospholamban phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **269**: 19151-19156.
- XIAO, R.P., JI, X., LAKATTA E.G., (1995). Functional coupling of the beta 2 adrenoceptor to a pertussis toxine sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.*, **47**:322-329.
- XIAO, R.P., TOMHAVE, D., WANG, D.J., JI, X., BOLUYT, M.O., CHENG, H., LAKATTA, E.G., KOCH, W.J., (1998). Age associated reductions in cardiac beta1 and beta2 adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J. Clin. Invest.*, **101**:1273-1281.
- XIAO, R.P., ZHU, W., ZHENG, M., CHAKIR, K., BOND, R., LAKATTA, E.G., CHENG, H., (2004). Subtype spesific beta adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends in Pharm. Sci.*, **25**(7):358-365.
- XIAO, RP., CHENG, H., KUSCHEL, M., LAKATTA, E.G., ZHOU, Y., (1999). Recent advances in cardiac β_2 -adrenergic signal transduction. *Circ. Res.*, **85**:1092-1100
- XIAO, RP., ZHU, W., ZHENG, M., CAO, C., ZHANG, Y., LAKATTA, E.G., HAN, Q., (2006). Subtype-specific α_1 - and b-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.27 No.6
- XIU, L.L., WENG, J.P., SUI, Y., WANG, J., YAN, J.H., HUANG, Z.M. (2004). Common variants in beta 3-adrenergic-receptor and uncoupling protein-2 genes are associated with type 2 diabetes and obesity. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **84**(5):375–379
- YASUDA, S., LEW, W.Y. (1997). Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca^{2+} in cardiac myocytes. *Circ Res.*, **81**(6):1011–1020
- YU, Z., MCNEILL, JH., (1991). Altered inotropic responses in diabetic cardiomyopathy and hypertensive-diabetic cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther.*, **257**:64-71
- ZERKOWSKI, HR., IKEZONO, K., ROHM, N., REIDEMEISTER, J., BRODDE, OE., (1986) Human myocardial β -adrenoceptors: demonstration of both β_1 - and β_2 - adrenoceptors mediating contractile responses to b-agonists on the isolated right atrium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **332**:142–147
- ZHANG, C., WILLIAMS, M.A., EDWARDS, K.L., AUSTIN, M.A. (2005a). Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene, prepregnancy obesity and risk of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, **17**(1), 19–28
- ZHANG, Z.S., CHENG, H.J., ONISHI, K., OHTE, N., WANNENBURG, T., CHENG, C.P. (2005b). Enhanced inhibition of L-type Ca^{2+} current by {beta}3-adrenergic stimulation in failing rat heart. *J Pharmacol Exp Ther.* **315**(3):1203–1211
- ZHAO, Q., WU, TG., JIANG, ZF., CHEN, GW., LIN, Y., WANG, LX., (2007). Effect of β -blockers on β_3 -adrenoceptor expression in chronic heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther.*, **21**:85–90
- ZHAO, XL., GUTIERREZ, LM., CHANG, CF., HOSEY, MM., (1994) The α_1 - subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem Biophys Res Commun.*, **198**:166–173

- ZHU, W.Z., KOCH, W.J., ZHENG, M., LEFKOWITZ, R.J., KOBILKA, B.K., XIAO, R.P., (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci.*, **98**:1607-12
- ZHU, W.Z., WANG, S.Q., CHAKIR, K., YANG, D., ZHANG, T., BROWN, J.H., DEVIC, E., KOBILKA, B.K., CHENG, H., XIAO, R.P., (2003). Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *J. Clin. Invest.*, **111**:617-625
- ZIMMERMAN, R., (2005). Microvascular complications of diabetes. *The Cleveland Clinic Disease Management Project*.
- ZISKOVEN, C., GRAFWEG, S., BOLCK, B., WIESNER, R., JIMENEZ, M., GIACOBINO, J.P., BLOCH, W., SCHWINGER, R.H., BRIXIUS, K., (2007). Increased Ca²⁺ sensitivity and protein expression of SERCA 2a in situations of chronic β_3 -adrenoceptor deficiency. *Eur J Physiol.*, **453**:443-453

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Gizem

Soyadı: Kaykı

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 1984

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD
Tandoğan/ANKARA

e-posta: gkayki@pharmacy.ankara.edu.tr

Telefon: 0 (312) 203 31 41

Eğitimi: 2002-2006 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
1995-2002 Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi, Balıkesir

Stajları: 08/2005-09/2005 : University of Arizona-College of Pharmacy-
Department of Pharmacy Practice and Science -
Arizona/Amerika Birleşik Devletleri
(The IPSF Student Exchange Program)
07/2005-08/2005 : Fako İlaçları A.Ş Kalite Kontrol Bölümü -
İstanbul
06/2004-08/2004 - 06/2003-08/2003 : Bahçelievler Eczanesi -
Balıkesir

Yabancı Dili: İngilizce, Fransızca, İtalyanca