DOI: 10.4274/atfm.02996

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2018;71(3):131-138

SGLT2 İnhibitörü Dapagliflozinin Hiperglisemi-Aracılı Kalp Fonksiyon Bozukluğu Üzerindeki Etkisinin Moleküler Temellerinin İncelenmesi*

An Investigation on Molecular Basis of the Effects of SGLT2 Inhibitor Dapagliflozin on Hyperglycemia-Associated Heart Dysfunction*

İb Ayşegül Durak¹, İb Yusuf Olğar¹, İb Sinan Değirmenci¹, İb Naci Ertürk², İb Muhammet Talha Akbaş², İb Ahmet Aygün², İb Mehmet Cihangir Deniz², İb Muhammed Furkan Erciyas², İb Burak Tahir Yazar², İb Mustafa Salih Yılmaz², İb Erkan Tuncay¹, İb Belma Turan¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara Türkiye

Öz

Amaç: Sodyum glukoz ko-transporter (SGLT) inhibitörlerinin diyabetli bireylerde glukoz re-absorpsiyonunu inhibe ederek kan şekerini düşürdüğü ileri sürülmektedir. Bu inhibitörlerin kalp fonksiyonu üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmemesine karşın, Na⁺/H⁺-değiştirici (NHE) inhibitörü gibi etkiler gösterebildiği ileri sürülmektedir. Bu çalışmada, SGLT2-inhibitörü Dapagliflozin (DAPA), *in vitro* olarak sıçan embriyonik hiperglisemik ventriküler hücrelerine (H9c2-hücre hattı) uygulanarak hücre seviyesindeki etki mekanizmasının elektrofizyolojik yöntemler kullanılarak incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: H9c2 hücreleri deney koşullarına hazır hale getirildikten sonra, H9c2'ler bir grubu 25 mM glukoz ile 24-saat veya 48-saat 37 °C'de inkübe edilerek hiperglisemik kardiyomiyositler (HG) elde edilmiş, bir diğer grubun inkübasyonu ise 25 mM glukoz ve DAPA (D185360, TORONTO Research Chemicals; 100 nM veya 1 µM) ile aynı sürelerde gerçekleştirilmiştir. Hücre içi iyon derişimleri [X]_{in}, [ROS]_{in} ve mitokondri membran potansiyeli, (MMP, X= Na⁺, Ca²⁺, H⁺, Zn²⁺) ölçümleri hücreler özel floresans boyalarla yüklenerek (DCFDA, FluoZin-3AM, JC-1, SNARF-1AM, FURA-2AM ve SBFI) konfokal mikroskobu ve mikrospektrofluorometre kullanılarak ölçülmüştür. Gruplar arası karşılaştırmalar student t-testi ile gerçekleştirilmiş ve anlamlılık (p) değeri 0,05'den küçük değerler kabul edilmiştir.

Bulgular: Normal ve hiperglisemik hücrelerde 1 µM DAPA uygulamasında toksik etkiler gözlemlendiğinden, tüm incelemeler 100 nM DAPA uygulaması ile yapılmıştır. [Na⁺]_{in} değeri bu uygulamalarda değişmezken, HG inkübasyonunda (48-saat) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olan [H⁺]_{in} değeri, DAPA uygulaması ile (24-saat ve 48-saat) çok belirgin olarak artmıştır. Buna karşın, HG'li hücrelerde (24-saat ve 48-saat) artmış olan [Zn²⁺]_{in} değerlerini DAPA uygulaması etkilememiştir. Buna karşın, HG'li hücrelerde (24-saat ve 48-saat) artmış olan [Ca²⁺]_{in} değerlerinin DAPA uygulaması ile normal değerlere yakın olduğu gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak, HG koşullarında önemli derecelerde artmış olan [ROS]_{in} değerinin DAPA ile normal değerler civarında gözlemlendiği, fakat HG sonucu depolarize durumdaki MMP'lerini etkilemediği sonuçları elde edilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak elde edilen verilerimiz, SGLT2 inhibitörlerinin HG hücrelerde, artan [H⁺]_{in} ve [ROS]_{in} baskılayarak, artmış olan bazal [Ca²⁺]_{in}'nin düzelmesine ve böylece kalbin kasılma-gevşeme aktivitesinin HG koşullarında normal fonksiyon göstermesine yol açabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hiperglisemi, Sodyum-Glukoz Ko-Taşıyıcı İnhibitörleri, Oksidatif Stres, Kalp Fonksiyonu, Hücre İçi İyon-Homeostazları

Abstract

Objectives: It has been reported that sodium glucose co-transporter (SGLT) inhibitors lowering blood glucose in diabetic patients via inhibiting glucose re-absorption. Although it has not been clearly identified the effects of these inhibitors on heart function, these inhibitors may act like Na⁺/

*Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem III Öğrencilerinin Kanıta Dayalı Tıp dersleri çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Belma Turan

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 312 595 81 86 E-posta: belma.turan@medicine.ankara.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-2583-9294

Geliş Tarihi/Received: 05.07.2018 Kabul Tarihi/Accepted: 05.11.2018

©Telif Hakkı 2018 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.

H⁺-exchanger (NHE) inhibitors. In this study, we were aimed to clarify the underlying cellular mechanism of a SGLT2-inhibitor, Dapagliflozin (DAPA), on hyperglycemic embryonic rat ventricular cells (H9c2 cell line) via electrophysiological measurements.

Materials and Methods: One group of H9c2 cells were incubated with high glucose (25 mM) medium for 24-hours and 48-hours at 37 °C to obtain hyperglycemic (HG) cardiomyocytes. Another group of H9c2 cells were incubated together with high glucose medium and DAPA (D185360, TORONTO Research Chemicals; 100 nM or 1 µM). Intracellular ion concentrations, ([X]_{in}), reactive oxygen species, ([ROS]_{in}) and mitochondrial membrane potential, (MMP) were monitored via specific fluorescent dyes (DCFDA, FluoZin-3AM, JC-1, SNARF, FURA-2AM and SBFI) with confocal microscope and microspectrofluorometer. All data are presented as mean (± SEM) and statistical analysis performed by student t-test. Significance level considered at p<0.05 for all comparisons.

Results: Due to the toxic effects of 1 µM DAPA incubation, all experiments were conducted with 100 nM DAPA incubated cells. [Na⁺]_{in} levels were not significantly changed in any group. Moreover, increased [H⁺]_{in} level in HG incubation (48-hours) significantly augmented following DAPA treatment (24-hours and 48-hours). However [Zn²⁺]_{in} levels in HG incubated (24-hours and 48-hours) cells were significantly increased, DAPA treatment had no further effect. In addition, increased [Ca²⁺]_{in} in HG reduced with DAPA treatment to control values. Importantly, DAPA treatment significantly reduced elevated [ROS]_{in} but did not improve depolarized MMP in HG cardiomyocytes.

Conclusion: In conclusion these results indicate that DAPA treatment restores [H⁺]_{in} and [ROS]_{in} homeostasis and improve contraction-relaxation activity of the heart in HG conditions.

Key Words: Hyperglycemia, Sodium-Glucose Co-Transporter Inhibitors, Oxidative Stress, Heart Function, Intracellular Ionic-Homeostasis

Giriş

Bireylerde, açlık kan şekeri düzeyi 70–110 mg/dL ve tokluk kan şekeri ise 140 mg/dL aralığında olup, bu değerlerin üzeri hiperglisemi olarak tanımlanmaktadır (<http://centralhospital.com/saglikrehberi/diyabet-ve-hiperglisemi/>). Hiperglisemi diyabetin komplikasyonlarından biridir ve oldukça sık karşılaşılan bir sorundur. Ayrıca, genel olarak vücuda alınan enerjinin harcanan enerjiye oranının artması sonucu bireylerde gelişen metabolik sendromda da obezite ile birlikte hiperglisemi ve hiperinsülinemi gözlenmektedir. Bu değişimler ise hipertansiyon ile karakterize çeşitli kardiyovasküler hastalıklar ve tip 2 diyabet için ciddi risk faktörü oluşturmaktadır (1,2).

Tip 2 diyabet genellikle yetişkinlerde ve nadiren gençlerde görülen, diyabetin daha ılımlı bir şeklidir. Dolaşımdaki insülin düzeyi çoğunlukla normal olmasına karşın, hedef dokuların duyarısızlığından dolayı göreceli olarak yetersizdir. Obezite, insülin etkilerinin hasarına yol açtığı için tip 2 diyabette genel bir risk faktörüdür (3). Önceki yıllarda yapılan istatistiksel analizler, tip 2 diyabetin genellikle obezite ve kalıtımla ilgili olduğunu ortaya koymaktadır (4). Dünyada, 2015 yılı istatistiklerine dayalı olarak, 2017 yılı değerlendirmesine (<http://www.diabetes.org/assets/pdfs/basics/cdc-statistics-report-2017>) göre tip 2 diyabetli sayısının 30,3 milyon kişi olduğunu, bu sayının ülkemizde (2016 yılı SGK değerlendirmesi) ise 6,3 milyon olduğunu ve nüfusun yaklaşık %7,9'unu oluşturduğunu işaret etmektedir (<https://www.iqvia.com/diabetes/turkiye-de-tip-2-diyabet>). Toplumlardaki görülme sıklığı gün geçtikçe artan metabolik sendromun ülkemizdeki prevalansı, erkeklerde %24–32, kadınlarda %39–45 oranındadır. Toplumlardaki görülme sıklığı gün geçtikçe artan metabolik sendromun ülkemizdeki prevalansı, erkeklerde %24–32, kadınlarda %39–45 oranındadır (5–7).

Diyabetli bireylerde çeşitli organ fonksiyon bozukluğu gözlenmekte olup, kardiyomiyopati koroner hastalığında

bağımsız olarak gelişen genel bir diyabet komplikasyonudur (8–10). Diyabetik kardiyomiyopatinin gelişiminde çeşitli etkenler rol oynamasına karşın, diyabetik kalpte hücre içi serbest Ca²⁺ seviyesindeki ([Ca²⁺]_i) ve [Ca²⁺]_i-homeostazındaki değişimlere bağlı gelişen kasılma yetersizliği gözlenmektedir (11–13).

Yapılan deneysel ve klinik incelemelerinde, hiperglisemiye dayalı kalp fonksiyon bozukluğunun altında yatan mekanizmalar arasında, temel olarak mitokondri fonksiyon bozukluğu ile artan oksidatif stres (reaktif oksijen ve nitrojen türleri; ROS ve RNS) ve/veya azalan antioksidan savunma mekanizması gibi faktörlerin bulunduğu ileri sürülmektedir (14–19). Han ve ark. (20) yaptıkları deneysel diyabet çalışmasında, renal sodyum-glukoz ko- taşıyıcılarının (SGLT) inhibisyonunun diyabet tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceğini hipotezlemişler ve seçici SGLT2 inhibitörü olan dapagliflozini (DAPA) *in vitro* ve *in vivo* olarak kullanarak, diyabetli sıçanlarda glukoz intoleransının düzeldiğini, kan şekerinin düştüğünü göstermişlerdir. Bir başka çalışmada SGLT2 inhibitörü olarak empagliflozin (EMPA) benzer diyabetik sıçanlarda kullanıldığında, insülin bağımsız yolların etkilenecek antidiyabetik etkinliğin arttığı ve β-hücrelerini koruduğu gösterilmiştir (21). Böylece bu ve buna benzer çalışma sonuçları, SGLT2 inhibitörlerinin böbrekten glukoz reabsorpsiyonunu arttırarak diyabetlilerde yeni bir sınıf anti-diyabetik medikasyon için kullanılabileceği, özellikle kalp yetmezliği için kullanılabileceği ileri sürülmüştür (22).

Son yıllarda SGLT2 inhibitörleri ile yapılan çalışmaların, bu inhibitörlerin etkisinin sodyum/hidrojen değiş-tokuşcusu (NHE) üzerinden olduğu üzerinde yoğunlaştığı gözlenmektedir. Bu değiş-tokuşcunun aktivitesi kalp yetmezliğinde önemli derecede arttığı ve EMPA uygulamasının glukoz reabsorpsiyonunu değil ama bu değiş-tokuşcuyu inhibe ettiği gösterilmiştir (23–25). Bu verileri destekleyen çalışmalarda, SGLT2 inhibitörlerinin kalp yetmezliği gelişimindeki veya ilerlemesindeki risk faktörleri azalttığını göstermişlerdir. Örneğin, yapılan bir hayvan çalışmasında DAPA uygulamasının enfarktüsli sıçan kalbinde

STAT3-sinyal yolağı aracılığı ile makrofaj polarizasyonunu regüle ederek hafiflettiğini göstermiştir (26). Bununla beraber, SGLT2 inhibitörlerinin kalp fonksiyonu üzerindeki pozitif etkisinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir ve hiperglisemik hastalardaki etkilerini arttırmak için daha detaylı incelemelere ihtiyaç vardır. Bu nedenlerle, bu çalışmada, DAPA uygulamasının hücre içi iyonik mekanizmalar ve oksidant ürünleri üzerindeki etkileri hiperglisemik ventriküler hücre kullanılarak (H9c2 hücre hattı) incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Çoğaltılması

Çalışmada embriyonik sıçan ventriküllerinden türetilmiş H9c2 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal dana serumu (FBS), %1 penisilin ve streptomisin, 4 mM L-glutamin ve 1 mM sodyum piruvat içeren DMEM içerisinde, standart filtreli hücre kültürü flasksı kullanılarak, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ seviyesinde olan inkübatör içerisinde tutularak büyütülmüştür. Hücrelerin ortamları 2 günde bir değiştirilmiş ve hücreler %70-80 sıklık düzeyine ulaştıklarında ise kaldırılıp 1:3 oranında flasksıya tekrar ekilmiştir. Hücreleri flask tabanından kaldırırken öncelikle fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 1 kez yıkanmış, daha sonra bir çeşit rekombinant hücre ayrıştırma enzimi olan TrypLE içerisinde yaklaşık olarak 2 dakika tutularak hücreler kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreleri içeren karışıma en az TrypLE hacmi kadar DMEM eklenerek 250 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, pelletlerin üst kısımları atılarak ve pelletlere DMEM eklenerek hücre karışımı elde edilmiştir. Elde edilen bu karışımın bir kısmı 1:3 oranında yeni flasksıya eklenerek hücreler büyümeye bırakılmış, diğer bir kısmı ise deneyde kullanılmak üzere 6 kuyulu plakalar içinde otoklavda steril hale getirilmiş ve kırık lameller üzerine ekilmiştir. Kırık lamellere ekilen hücreler daha sonra 5-7 gün beklenerek deneylerde kullanılmıştır. Bu çalışmada pasaj numarası 10-20 arası olan H9c2 hücreleri kullanılmıştır.

Hiperglisemik hücreler ve SGLT2 inhibitör uygulaması

H9c2 hücreleri 25 mM glukoz ile 24-saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edilerek hiperglisemik hücreler elde edilmiştir. Normal ve hiperglisemik hücreler 100 nM ve 1 µM DAPA ile 24-saat ve 48-saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiş ve MTT hücre canlılık testi uygulanmıştır. Hücrelerin 1 µM DAPA uygulamasında toksik etkiler gözlemlendiğinden, tüm incelemeler 100 nM DAPA uygulanmış hücrelerde yapılmıştır.

Hücre içi Serbest Na⁺ Ölçümü

Bu ölçümler için Na⁺ duyarlı bir floresans boya SBFI (sodium-binding benzofuran isophthlate) kullanılmıştır. Hücreler oda sıcaklığında 3 µM SBFI ile 45 dk inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra Nikon-epifloresans mikroskobuna yerleştirilmiş ve

HEPES çözeltisi ile hücrelerin perfüzyonu sağlanmıştır. Hücreler 340-380 nm'de uyarılmış olup, floresans toplama 510 nm'da ölçülmüştür. Arka-plan (background) floresansı çıkarılarak floresans şiddetleri oranı hesaplanmıştır. Floresans değişiklikler oransal olarak PTI Ratiometer mikrospektrofluorometre ve FELIX programı ile kaydedilmiştir (27).

Hücre içi Serbest Ca²⁺ Ölçümü

Hücreler Ca²⁺ duyarlı bir floresans olan Fura-2 AM (3 µM) kullanılarak görüntülenmiştir. Hücreler bu boya ile oda sıcaklığında 45 dk inkübe edildikten sonra, mikrospektrofluorometre (PTI RatioMaster) kullanılarak ve 340 ve 380 nm'de uyarılarak 510 nm'de toplanarak floresans oranların ölçülmesi ile hücre içi serbest Ca²⁺ derişimi dinlenim durumunda ölçülmüştür (28). Elde edilen floresans değişimleri Felix (PTI) programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Hücre içi Serbest Zn²⁺ Ölçümü

Hücre içi serbest Zn²⁺ miktarlarının belirlenmesi için hücreler Zn²⁺'na duyarlı (K_d=15 nM) bir boya olan ve 490 nm dalga boyunda uyarılıp, 520 nm dalga boyunda emisyon veren FluoZin-3AM boyası ile (3 µM) 45 dk boyunca inkübe edildikten sonra de-esterifikasyon için 4-5 defa yıkanarak hücre içi serbest Zn²⁺ derişimi ([Zn²⁺]_{in}) ölçümleri için hazır hale getirilmiş ve [Zn²⁺]_{in} konfokal mikroskobu ile ölçülmüştür. Hücrelerden 4 dakika boyunca bazal kayıt aldıktan sonra (F), sırasıyla bir Zn²⁺ iyonoforu olan 1-hydroxypyridine-2-thione zinc-salt (ZnPT; 10 µM) verilerek maksimum sinyal (F_{maks}), daha sonra Zn²⁺ tutucusu olan tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN; 50 µM) verilerek minimum sinyal elde edilmiştir (F_{min}). FluoZin-3'ün bilinen K_d değerinden yararlanılarak bazal Zn²⁺ seviyesi, [Zn²⁺]_{in} = K_d x (F-F_{min})/(F_{maks}-F) eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmıştır (18).

Hücre içi Serbest H⁺ Ölçümü

Hücre içi pH'nın (pH_{in}) görüntülenmesi için SNARF boyasının asetometil ester (AM) kullanılmıştır. Hücreler oda sıcaklığında 45 dk 3 µM SNARF-1AM ile inkübe edilmiş ve pH_{in} konfokal mikroskobuyla ölçülmüştür. SNARF-1 540 nm'de uyarılırken emisyon sinyalleri 590 ve 640 nm'de toplanmıştır. SNARF boyası 540 nm eksitasyon sonrasında 590 ve 640 nm'de pH bağımlı olarak ters yönde hareket eden 2 emisyon sinyali oluşturur. 590 nm'deki emisyon sinyali pH'nın alkaliye kayması ile azalma gösterirken, 640 nm'deki sinyal ise artış göstermektedir. Elde edilen floresans emisyon şiddetleri (E₅₉₀/E₆₄₀) oranlanarak pH_{in} değişimi hesaplanmıştır.

Mitokondri Membran Potansiyelinin (MMP) Ölçülmesi

MMP'nin ölçülmesi için JC-1 (3 µM – 45 dk) floresans boyası kullanılmıştır. Mitokondri membran potansiyeli ile ilgili floresans görüntülemesi yapmak için lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak (Leica TCS SP5) ve fotobleaching etkisini azaltmak

ve hızlı tarama yapabilmek için düşük çözünürlükte görüntü alınması ve lazer gücünün minimumda tutulmasına özen gösterilmiştir. Hücrelere carbonyl cyanide4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone; FCCP (1 μ M) verilerek mitokondri membran potansiyeli kalibre edilmiştir. Daha sonra floresans sinyali şiddet değişiminden arka plan sinyali çıkarıldıktan sonra $\Delta\Psi_m = F - F_0/F_0$ (F_0 =ölçülen bazal sinyal, F =maksimum veya minimum floresans değeri) formülü kullanılarak membran potansiyel değişimleri hesaplanmıştır.

Reaktif Serbest Oksijen (ROS) Türlerinin Ölçümü

Hücrelerde ROS oluşumu H_2O_2 varlığında konfokal mikroskobu kullanılarak ölçülmüştür. Bunun için, hücreler ROS duyarlı DCFDA (5 μ M – 45 dk) boyası ile yüklendikten sonra konfokal mikroskobunda xyt modunda 490 nm uyarım dalga boyu ile 520 nm emisyon toplama dalga boyu olarak seçilerek ölçümler yapılmıştır. Bazal ROS miktarını hesaplamak için bazal floresan değeri (F_0) kayıtladıktan sonra ortama 100 μ M H_2O_2 eklenmiş, maksimum floresan sinyali (F_{maks}) elde edilmiştir. Bazal ROS miktarı $[ROS]_{in} = [(F_{maks} - F_0)/F_0]$ formülüne göre hesaplanmıştır. Floresans şiddet değişimi hiperglisemik ve normal hücreler arasında karşılaştırılarak bazal ROS miktarları gösterilmiştir (19).

İstatistiksel Analiz

Tüm deney sonuçları ortalama ($\pm$ SEM) olarak verilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık seviyesi ANOVA (tukey-post-hoc) testi kullanılarak belirlenmiştir. Tüm değerlendirmelerde, istatistiksel anlamlılık test değeri ($p < 0,05$) seçilmiştir.

Bulgular

SGLT2 İnhibitörü Dapagliflozin Uygulaması ve $[Na^+]_{in}$

Embriyonik ventriküler hücre hattı (H9c2) dapagliflozin (DAPA) 1 μ M seviyelerde uygulandığında çeşitli sitotoksik etkilere neden olduğu için, tüm deneysel ölçümler 100 nM DAPA ile inkübe edilen hücrelerde yapılmıştır. Normal hücrelerle karşılaştırmalı olarak, hiperglisemik (HG), ve DAPA uygulanmış HG'li H9c2'ler Na^+ nuna duyarlı SBFI ile yüklendikten sonra, oransal olarak bazal $[Na^+]_{in}$ değerleri ölçülerek ortalama değerler bar-grafik olarak sunulmuştur. Şekil 1'de görüldüğü gibi, DAPA uygulaması HG'li hücrelerde zaten değişmemiş olan bazal $[Na^+]_{in}$ değerini (ne 24-saat ne de 48-saat) etkilememiştir. Bu ölçüm sonuçları ne HG'nin ne de SGLT2 inhibisyonunun $[Na^+]_{in}$ değiştiremediğini göstermiştir.

SGLT2 İnhibitörü Dapagliflozin Uygulaması ve $[Ca^{+2}]_{in}$

Normal ve HG hücreleri (24-saat ve 48-saat inkübasyon) ile yine 24-saat ve 48-saat DAPA uygulanan HG hücreleri Ca^{+2} nuna duyarlı Fura-2AM ile yüklendikten sonra, oransal olarak bazal $[Ca^{+2}]_{in}$ değerleri ölçülerek ortalama değerler Şekil 2'de sunulmuştur. Şekilde görüldüğü gibi, HG'li hücrelerde $[Ca^{+2}]_{in}$

Şekil 1: Hiperglisemik kardiyomiyositlerde SGLT₂ inhibitörünün $[Na^+]_{in}$ 'na etkisi. Hücreler 24- ve 48-saat DAPA uygulamasından sonra 3 μ M SBFI-AM ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip mikrospektrofluorometre ile $[Na^+]_{in}$ ölçümü yapılmıştır. Veriler ortalama ($\pm$ SEM) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=25-30 hücre

değerleri normal hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek gözlenirken, her iki süre DAPA uygulamasının bu artışları istatistiksel olarak anlamlı seviyede engellemiştir ($p < 0,05$). Bu ölçüm sonuçları DAPA uygulamasının, HG'li hücrelerde bazal $[Ca^{+2}]_{in}$ artışını engelleyerek, kalbin kasılma aktivitesine pozitif etkiler yapabileceğini işaret etmektedir.

SGLT2 İnhibitörü Dapagliflozin Uygulaması ve $[H^+]_{in}$

Normal ve 24-saat ve 48-saat yüksek glukoz ile inkübe edilen hücreler (HG) ile yine 24-saat ve 48-saat DAPA uygulanan HG'li hücreler H^+ nuna duyarlı SNARF-1AM ile yüklendikten sonra, oransal olarak bazal $[H^+]_{in}$ değerleri ölçülerek ortalama değerler Şekil 3'de sunulmuştur. Şekilde görüldüğü gibi, HG'li hücrelerde $[H^+]_{in}$ değerleri normal hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek gözlenirken, her iki süre DAPA uygulaması bu artışları istatistiksel olarak anlamlı seviyede engellemiştir ($p < 0,05$). Bu ölçüm sonuçları DAPA uygulamasının, HG'li hücrelerde bazal $[H^+]_{in}$ artışını engelleyerek, kalbin kasılma aktivitesine pozitif etkilerle katkıda bulunabileceğini işaret etmektedir.

Şekil 2: Hiperglisemik kardiyomiyositlerde SGLT₂ inhibitörünün $[Ca^{2+}]_i$ 'na etkisi. Hücreler 24- ve 48-saat DAPA uygulamasından sonra 3 μM FURA2-AM ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra mikrospektrofluorometre ile $[Ca^{2+}]_i$ ölçümü yapılmıştır. Veriler ortalama ($\pm$ SEM) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n= 20-30 hücre. *p<0,05 KON grubuna göre; #<0,05 HG grubuna göre

SGLT2 İnhibitörü Dapagliflozin Uygulaması ve $[Zn^{2+}]_i$

Konfokal mikroskopu kullanılarak, normal ve 24-saat ve 48-saat yüksek glukoz ile inkübe edilen hücreler (HG) ile yine 24-saat ve 48-saat DAPA uygulanan HG'li hücreler Zn^{2+} 'nuna duyarlı Fluo-Zin3 ile yüklendikten sonra, metod bölümünde açıklandığı gibi, floresans şiddetinde kat-değişim olarak, bazal $[Zn^{2+}]_i$ değerleri ölçülerek ortalama değerler Şekil 4'de sunulmuştur. Ortalama değişimlerden anlaşılabileceği gibi, 24-saat ve 48-saat yüksek glukozla maruz kalmış hücrelerde, bazal $[Zn^{2+}]_i$ değerleri benzer artışlarda iken, DAPA uygulamasının da benzer şekilde etkilere neden olduğu gözlenmiştir. DAPA uygulaması HG ile $[Zn^{2+}]_i$ artışını istatistiksel olarak anlamlı seviyede engellemiştir (p<0,05).

SGLT2 İnhibitörü Dapagliflozin Uygulamasının $[ROS]_i$ ve MMP Üzerindeki Etkileri

Hücre düzeyinde reaktif oksijen türleri oluşum seviyesi $[(ROS)]_i$ konfokal mikroskopu kullanılarak, normal ve 24-saat ve 48-saat yüksek glukoz ile inkübe edilen hücreler (HG) ile yine 24-saat ve 48-saat DAPA uygulanan HG'li hücrelerde, ROS duyarlı DCFDA boyası ile yüklenerek, H_2O_2 'ye verilen yanıt olarak ölçülmüştür. Şekil 5'de görüldüğü gibi, HG'li hücrelerin

Şekil 3: Hiperglisemik kardiyomiyositlerde SGLT₂ inhibitörünün $[H^+]_i$ 'na etkisi. Hücreler 24- ve 48-saat DAPA uygulamasından sonra 3 μM SNARF-1AM ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra konfokal mikroskopuyla $[H^+]_i$ ölçümü yapılmıştır. Veriler ortalama ($\pm$ SEM) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=15-20 hücre. *p<0,05 KON grubuna göre; #<0,05 HG grubuna göre

Şekil 4: Hiperglisemik kardiyomiyositlerde SGLT₂ inhibitörünün $[Zn^{2+}]_i$ 'na etkisi. Hücreler 24- ve 48-saat DAPA uygulamasından sonra 3 μM FluoZin-3AM ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra konfokal mikroskopuyla $[Zn^{2+}]_i$ ölçümü yapılmıştır. Maksimum yanıt için 10 μM ZnPT uygulaması yapılmış, minimum yanıt ise 50 μM TPEN verilerek sağlanmıştır. Veriler ortalama ($\pm$ SEM) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=20-30 hücre. *p<0,05 KON grubuna göre

Şekil 5: Hiperglisemik kardiyomiyositlerde SGLT₁ inhibitörünün [ROS]_{in}'a etkisi. Hücreler 24- ve 48-saat DAPA uygulamasından sonra 5 µM Oksidan duyarlı floresan bir boya olan DCFDA ile 45 dakika inkübe edilmiştir. Hücrelerden basal bir yanıt alındıktan sonra 100 µM H₂O₂ verilerek maksimum durum gözlenmiştir. Veriler ortalama (±SEM) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=15-20 hücre. *p<0,05 KON grubuna göre; #p<0,05 HG grubuna göre

H₂O₂'ye verdikleri yanıt çok belirgin olarak yüksek olup (p<0,05), DAPA uygulaması bu artışı istatistiksel olarak anlamlı seviyede engellemiştir (p<0,05).

Bir başka grup incelemelerimizde, mitokondri membran potansiyelinin (MMP) HG'li hücrelerdeki değişimi ile bu değişime DAPA etkisi, hücreler floresans JC-1 ile yüklenerek konfokal mikroskobu ile ölçülmüştür. İncelemelerde yine 24-saat ve 48-saat uygulaması yapılmış hücreler kullanılmıştır. Ortalama değişimler Şekil 6'da bar-grafik olarak sunulmuştur. HG'li hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı seviyede (p<0,05) MMP depolarizasyonu gözlenirken, DAPA uygulamasının bu depolarizasyonu değiştiremediği gözlenmiştir.

Tartışma

Metabolik sendrom ve tip 2 diyabet, genel olarak tüm dünyada insanların yaşamını tehdit eden, yaşam kalitesini bozan ve çoğunlukla çeşitli organ fonksiyon bozukluğu ile süregelen bir hastalık grubudur. Bu hastalarda yüksek kan şekeri (hiperglisemi) düzeyi ve insülin direnci (hiperinsülinemi) gözlenmektedir. Deneysel çalışma sonuçları ile klinik bulgular, bu grup bireylerde bazal kalp fonksiyonunun bozulduğu, örneğin sol ventrikül sistolik basıncı azalırken diyastolik basınç değerinin arttığı, ve

Şekil 6: Hiperglisemik kardiyomiyositlerde SGLT₁ inhibitörünün [MMP]'ine etkisi. Hücreler 24- ve 48-saat DAPA uygulamasından sonra 3 µM JC-1 ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra konfokal mikroskobuyla [MMP] ölçümü yapılmıştır. MMP yanıtı için hücrelere 1 µM FCCP verilerek mitokondri depolarizasyonu sağlanmıştır. Veriler ortalama (±SEM) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=20-30 hücre. *p<0,05 KON grubuna göre

bu değişikliklerin kalpte aritmi görülme olasılığını arttırdığını bildirmektedir (29-32). Bu bulgularda genel olarak kalbin elektriksel aktivitesinde başlayan bozulmaların kalbi mekanik aktivite yetersizliğine taşıdığı da bilinmektedir.

İnsanlarda hiperglisemi ve insülin direnci ile ilgili çeşitli oral anti-diyabetik ilaçlar randomize-kontrollü bir şekilde kullanılmakta olup bunların etkileri ile ilgili birbiri ile daima örtüşen sonuçlar elde edilememektedir (33-35). Bu hususta daha detaylı incelemelere ihtiyaç olduğu açıkça görülmektedir. SGLT2 inhibitörleri glukoz ve insülin kontrolü için, hayvan ve insan çalışmalarında kullanılmış olup, farklı pozitif etkiler gözlenmiştir. Bu grup inhibitörler tip1 diyabet yanında tip 2 diyabette de kullanılmış ve oldukça önemli yararlı etkileri gözlenmiştir (36-38). Bunlar arasında kan şekerini düşürmesi ve vücut ağırlığında azalmaya neden olması önemli etkileri arasındadır (39-42). Bu alanda yapılan bir çalışmada, SGLT2 inhibitörü empagliflozin (EMPA) diyabetik sıçanlara uygulanmış ve insülin bağımsız yolların etkilenecek antidiyabetik etkinliğin arttığı ve β-hücrelerinin korunabildiği gösterilmiştir (21). Ayrıca, bir başka çalışma sonuçlarının ışığı altında, SGLT2 inhibitörlerinin böbrekten glukoz reabsorpsiyonunu

arttırarak diyabetlilerde yeni bir sınıf anti-diyabetik tedavi için kullanılabilecekleri, özellikle kalp yetmezliği için önemli önleyici etkileri olduğu ileri sürülmüştür (22).

Diyabetik kardiyomiyopatinin gelişiminde çeşitli etkenler rol oynamasına karşın, diyabetik kalpte hücre içi serbest Ca^{2+} seviyesindeki ($[Ca^{2+}]_i$) ve $[Ca^{2+}]_i$ -homeostazındaki değişimlere bağlı gelişen kasılma yetersizliği gözlenmektedir (11-13). Bu çalışmada, SGLT2 inhibitörünün HG'li kardiyomiyositlerde kullanılmasının bazal $[Ca^{2+}]_i$ -seviyesini koruyarak $[Ca^{2+}]_i$ -homeostazına önemli katkılarda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu çalışma sonuçları, HG ile artan ROS üretiminin DAPA uygulaması ile önlenmesi, diyabet gibi kronik durumlarda oksidatif stresin bu ajan aracılığı ile kontrol altında tutularak kalbin aktivitesinin korunabileceğini ve/veya kalp fonksiyon bozukluğunun tedavi edilebileceğini işaret etmektedir. Zira, yapılan deneysel ve klinik incelemelerde, hiperglisemiye dayalı kalp fonksiyon bozukluğunun altında yatan mekanizmalar arasında, temel olarak mitokondri fonksiyon bozukluğu ile artan oksidatif stres (ROS ve RNS artışı kaynaklı) ve/veya azalan antioksidan savunma mekanizması gibi faktörlerin bulunduğu ileri sürülmüştür (14-19,43). Bulgularımız önceki çalışma sonuçlarını ve hipotezleri kuvvetlice desteklemektedir.

Diğer yandan, SGLT2 inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda, etkisinin NHE-aracılı olduğu ileri sürülmektedir. Çünkü, NHE aktivitesi kalp yetmezliğinde önemli derecede artmakta ve EMPA uygulamasının glukoz reabsorpsiyonunu değil ama bu değiş-tokuşu inhiye ederek koruyucu/edici etkilere sahip olduğuna işaret edilmiştir (23-25). Bu hipotezleri destekleyen başka çalışmalarda, SGLT2 inhibitörlerinin kalp yetmezliği gelişimindeki veya ilerlemesindeki risk faktörlerini azalttığını göstermişlerdir (26). Bu çalışmada, hiperglisemik koşullarda kardiyomiyositlerde artan $[H^+]_i$ ve $[ROS]_i$ değerlerinin DAPA uygulaması ile baskılanabilmesi, bu inhibitörlerin hem hücrelerde ROS yolağını hem de NHE yolağını etkileyerek, artmış olan bazal $[Ca^{2+}]_i$ 'nin düzelmesine ve böylece kalbin kasılma-gevşeme aktivitesinin HG koşullarında normal fonksiyon göstermesine yol açabileceğini işaret etmektedir.

Sattar ve ark. (44) SGLT2 inhibitörleri ve kardiyovasküler süreçlerdeki etkileri ile ilgili geniş kapsamlı yaptıkları EMPA-REG çalışmada sürpriz çıktıları ve olası mekanizmaları sergilemişlerdir. Bu çalışmada, olası pozitif etkiler arasında empagliflozin kullanılmasının, kalp yetmezliğini azaltıcı etkileri arasında diüretik etki ile kalpte ön-yüklemeyi (pre-load) azalttığı, periferik damar direncini düşürerek, ön-yükleme ve sonradan-yüklemeyi azaltarak sistolik basıncı düşürdüğü, kalp metabolizmasını arttırarak sistolik ve diastolik basıncı düzelttiği ileri sürülmüştür. Daha az olası etkiler arasında ise, hipertrofi ve fibroz oluşumunda azalma, kalp atım hızında düzenlenme, miyokardiyal iskemi ve aritmide azalmalar olabileceği ileri sürülmüştür.

Sonuç

Sonuç olarak *in vitro* koşullarda DAPA ile gerçekleştirilen bu çalışma sonuçları, SGLT2 inhibitörlerinin metabolik sendrom- ve/veya tip 2 diyabet-indüklü kalp fonksiyon bozukluğunda birden fazla hücre içi yolağı etkileyerek, bu bireylerde kalbin mekanik aktivitesi üzerinde koruyucu etkilere neden olabileceğini işaret etmektedir. Bu hususta yapılacak *in vivo* çalışmaların, konunun daha detaylı anlaşılmasını sağlayarak klinik uygulamalara ışık tutacağı görülmektedir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Etik kurul onayı alınmamıştır.

Hasta Onayı: Hasta onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: B.T., Dizayn: B.T., Veri Toplama veya İşleme: A.D., Y.O., S.D., N.E., M.T.A., A.A., M.C.D., M.F.E., B.T.Y., M.S.Y., Analiz veya Yorumlama: Y.O., E.T., Literatür Arama: A.D., Y.O., S.D., N.E., M.T.A., A.A., M.C.D., M.F.E., B.T.Y., M.S.Y., Yazan: B.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışmanın finansal desteği, TÜBİTAK SBAG-214S254 nolu projeden sağlanmıştır.

Kaynaklar

1. Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, et al. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(10): 3120-7.
2. Meigs JB, Larson MG, D'Agostino RB, et al. Coronary artery calcification in type 2 diabetes and insulin resistance: the framingham offspring study. *Diabetes Care* 2002; 25(8): 1313-1319.
3. Fleischman A and Rhodes ET. Management of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes in children: consensus and controversy. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2009; 2: 185-202.
4. Porte D and Woods SC. Regulation of food intake and body weight in insulin. *Diabetologia* 1981; 20 Suppl: 274-280.
5. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002; 25(9): 1551-1556.
6. Gundogan K, Bayram F, Capak M, et al. Prevalence of metabolic syndrome in the Mediterranean region of Turkey: evaluation of hypertension, diabetes mellitus, obesity, and dyslipidemia. *Metab Syndr Relat Disord* 2009; 7(5): 427-434.
7. Onat A, Yuksel M, Koroglu B, et al. [Turkish Adult Risk Factor Study survey 2012: overall and coronary mortality and trends in the prevalence of metabolic syndrome]. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2013; 41(5): 373-378.
8. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 1972; 30(6): 595-602.
9. Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, et al. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res* 1980; 47(6): 922-933.
10. Penpargkul S, Schaible T, Yipintsoi T, et al. The effect of diabetes on performance and metabolism of rat hearts. *Circ Res* 1980; 47(6): 911-921.

11. Pierce GN and Russell JC. Regulation of intracellular Ca^{2+} in the heart during diabetes. *Cardiovasc Res* 1997; 34(1): 41-47.
12. Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, et al. Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(4): H1398-1408.
13. Ozdemir S, Ugur M, Gurdal H, et al. Treatment with AT(1) receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca^{2+} transients and contractile function of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2005; 435(1): 166-174.
14. Aydemir-Koksoy A, Bilginoglu A, Sariahmetoglu M, et al. Antioxidant treatment protects diabetic rats from cardiac dysfunction by preserving contractile protein targets of oxidative stress. *J Nutr Biochem* 2010; 21(9): 827-833.
15. Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, et al. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88(10): 993-1001.
16. Whaley-Connell A and Sowers JR. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2012; 14(4): 360-365.
17. Ilkun O and Boudina S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. *Curr Pharm Des* 2013; 19(27): 4806-4817.
18. Tuncay E, Okatan EN, Vassort G, et al. ss-blocker timolol prevents arrhythmogenic Ca^{2+} release and normalizes Ca^{2+} and Zn^{2+} dyshomeostasis in hyperglycemic rat heart. *PLoS One* 2013; 8(7): e71014.
19. Tuncay E, Okatan EN, Toy A, et al. Enhancement of cellular antioxidant-defence preserves diastolic dysfunction via regulation of both diastolic Zn^{2+} and Ca^{2+} and prevention of RyR2 -leak in hyperglycemic cardiomyocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 290381.
20. Han S, Hagan DL, Taylor JR, et al. Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats. *Diabetes* 2008; 57(6): 1723-1729.
21. Hansen HH, Jelsing J, Hansen CF, et al. The sodium glucose cotransporter type 2 inhibitor empagliflozin preserves beta-cell mass and restores glucose homeostasis in the male Zucker diabetic fatty rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 350(3): 657-664.
22. Riggs K, Ali H, Taegtmeier H, et al. The Use of SGLT-2 Inhibitors in Type 2 Diabetes and Heart Failure. *Metab Syndr Relat Disord* 2015; 13(7): 292-297.
23. Martens P, Mathieu C, and Verbrugge FH. Promise of SGLT2 Inhibitors in Heart Failure: Diabetes and Beyond. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2017;19(3):23.
24. Packer M, Anker SD, Butler J, et al. Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors for the Treatment of Patients With Heart Failure: Proposal of a Novel Mechanism of Action. *JAMA Cardiol* 2017;2(9):1025-1029.
25. Kosiborod M, Cavender MA, Fu AZ, et al. Lower Risk of Heart Failure and Death in Patients Initiated on Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors Versus Other Glucose-Lowering Drugs: The CVD-REAL Study (Comparative Effectiveness of Cardiovascular Outcomes in New Users of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors). *Circulation* 2017;136(3):249-259.
26. Lee TM, Chang NC, and Lin SZ. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic Biol Med* 2017; 104: 298-310.
27. Bilginoglu A, Kandilci HB, and Turan B. Intracellular levels of Na^{+} and TTX-sensitive Na^{+} channel current in diabetic rat ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Toxicol* 2013;13(2):138-47.
28. Yaras N, Ugur M, Ozdemir S, et al. Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca^{2+} homeostasis in rat heart. *Diabetes* 2005;54(11):3082-8.
29. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, et al. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;57(1):51-64.
30. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, et al. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* 2006; 55(7):928-934.
31. Okatan EN, Tuncay E, Hafez G, et al. Profiling of cardiac beta-adrenoceptor subtypes in the cardiac left ventricle of rats with metabolic syndrome: Comparison with streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2015;93(7):517-525.
32. Dutta K, Podolin DA, Davidson MB, et al. Cardiomyocyte dysfunction in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Diabetes* 2001; 50(5): 1186-92.
33. George P and McCrimmon RJ. Potential role of non-insulin adjunct therapy in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2013;30(2):179-188.
34. Stone ML, Walker JL, Chisholm D, et al. The addition of rosiglitazone to insulin in adolescents with type 1 diabetes and poor glycaemic control: a randomized-controlled trial. *Pediatr Diabetes* 2008;9(4 Pt 1):326-334.
35. Polsky S and Ellis SL. Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015;22(4):277-282.
36. Ahmadieh H, Ghazal N, and Azar ST. Role of sodium glucose cotransporter-2 inhibitors in type I diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2017;10:161-167.
37. Ferrannini E, Ramos SJ, Salsali A, et al. Dapagliflozin monotherapy in type 2 diabetic patients with inadequate glycemic control by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Diabetes Care* 2010; 33(10): 2217-2224.
38. Bailey CJ, Iqbal N, Tjoen C, et al. Dapagliflozin monotherapy in drug-naïve patients with diabetes: a randomized-controlled trial of low-dose range. *Diabetes Obes Metab* 2012;14(10): 951-959.
39. Strojek K, Yoon KH, Hruha V, et al. Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with glimepiride: a randomized, 24-week, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13(10): 928-938.
40. Wilding JP, Charpentier G, Hollander P, et al. Efficacy and safety of canagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with metformin and sulphonylurea: a randomised trial. *Int J Clin Pract* 2013; 67(12): 1267-82.
41. Haring HU, Merker L, Seewaldt-Becker E, et al. Empagliflozin as add-on to metformin in patients with type 2 diabetes: a 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care* 2014; 37(6): 1650-1629.
42. Scheen AJ. Pharmacodynamics, efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2015; 75(1): 33-59.
43. Whaley-Connell A and Sowers JR. Is it time to target prehypertension. *Cardiovasc Ther* 2010; 28(6): 337-338.
44. Sattar N, McLaren J, Kristensen SL, et al. SGLT2 Inhibition and cardiovascular events: why did EMPA-REG Outcomes surprise and what were the likely mechanisms? *Diabetologia* 2016; 59(7): 1333-1339.