

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
KESİN RAPORU**

Adrenerjik Reseptör Blokeri İlaçların Kalbin Substrat  
Metabolizması Üzerindeki Etkilerinin  
Miyosit Hücre Kültürlerinde İncelenmesi

Proje Yürütücüsü: Arzu ONAY-BEŞİKÇİ  
Yardımcı Araştırmacılar: Ali Murat İRAT,  
Elif SÜZMEÇELİK

Proje Numarası: 09H3336001

Başlama Tarihi: 10.03.2009

Bitiş tarihi: 10.03.2010

Rapor Tarihi: 16.09.2010

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara - " 2010 "

# İÇİNDEKİLER

1. Türkçe ve İngilizce Özet .....	4
1.1. Özet .....	4
1.2. Abstract .....	5
2. Amaç ve Kapsam .....	6
2.1. Amaç .....	6
2.2. Kapsam.....	6
III. MATERYAL ve YÖNTEM.....	8
3.1. Hücre Kültürü .....	8
3.2. Validasyon.....	8
3.3. Dinlenme halindeki hücrelerde substrat metabolizması.....	8
3.4. Adrenalinle stimüle edilen hücrelerde substrat glukoz metabolizması.....	9
3.5. Yağ Asidi Oksidasyonu .....	9
3.6. Glukoz Oksidasyonu .....	9
3.7. Glikoliz .....	9
3.8. İstatistiksel Analizler.....	9
IV. ANALİZ ve BULGULAR .....	11
4.1. Validasyonlar ve Ön Denemeler .....	11
4.2. Metabolik Deneyler .....	11
4.3. Glikoliz Hızı .....	11
4.4. Glukoz Oksidasyonu Hızı .....	13
4.5. Palmitik Asit Oksidasyonu Hızı.....	14
V. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	17
VI. KAYNAKLAR .....	20
a) Mali Bilanço ve Açıklamaları.....	25
b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar.....	25
c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar .....	25
d) Sunumlar.....	25

## TABLO VE ŞEKİLLER

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo.1.</b> Enerjetik Substratların Tümüyle Oksitlenmeleri İle Elde Edilen ATP ve Bunun İçin Tüketilen Oksijen	<b>9</b>
<b>Şekil 1.</b> Adrenerjik reseptör aktivasyonunun olası metabolik etkileri	<b>13</b>
<b>Şekil 2.</b> Dördüncü Pasaj Sonunda Glikoliz Hızı	<b>17</b>
<b>Şekil 3.</b> Glikoliz Hızı	<b>17</b>
<b>Şekil 4.</b> Glukoz Oksidasyonu Hızı	<b>18</b>
<b>Şekil 5.</b> Kontrol ve AICAR içeren ortamlarda palmitik asit oksidasyon hızı	<b>19</b>
<b>Şekil 6.</b> Karvedilol, Bisoprolol ve Propranololün Palmitik Asit Oksidasyonu Hızına Etkisi	<b>19</b>
<b>Şekil 7.</b> Palmitik Asit Oksidasyonu Hızı	<b>20</b>

## 1. Türkçe ve İngilizce Özet

### 1.1. Özet

Beta adrenerjik reseptör bloke edici ilaçlar ( $\beta$ -blokerler) hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları ve aritmiler gibi çok sayıda kardiyovasküler hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Geçmişte kalp yetmezliği tedavisinde kontrindike oldukları düşünülmüşse de, günümüzde kalp yetmezliği semptomlarını ve mortaliteyi azalttıkları için bazı  $\beta$ -blokerler tedavide başarıyla kullanılmaktadırlar. Bu indikasyonda kullanılan  $\beta$ -blokerler, etkinlik yönünden birbirlerinin aynı değildir. Hem  $\alpha_1$  hem de  $\beta$  adrenerjik reseptörleri bloke eden karvedilolün, kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan öteki  $\beta$ -blokerlere üstünlük gösterdiği klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmada karvedilol'ün miyosit substrat kullanımı üzerindeki olası etkileri incelenmiş ve bu etkiler öteki  $\beta$ -blokerlerle karşılaştırılmıştır. C2C12 hücreler %10 fetal sığır serumu içeren DMEM ortamında büyütülmüş ve %1 serumlu çözeltilerde farklılaştırılmıştır. Metabolik her substrat için validasyon ve kullanılan ilaçlar için doz belirleme süreçlerinden sonra hücrelerin kontrol (herhangi bir ilaç içermeyen) ve ilaç tedavili ortamlarda metabolik hızları belirlenmiştir. Karvedilol, hem dinlenme durumundaki hem de adrenalinle stimüle edilen hücrelerde 100  $\mu$ M dozda uzun zincirli yağ asidi kullanımını yaklaşık %40 azaltıp glikoliz hızını da arttırmıştır. Benzer etkiler prazosin ( $\alpha_1$  bloker) kullanımı ile de gerçekleşirken propranolol ve bisoprolol bu parametreleri etkilememiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında, karvedilol'ün enerjetik substrat metabolizması üzerindeki etkilerinin  $\beta$  reseptörlere ek olarak  $\alpha_1$  reseptörleri de bloke etmesinden kaynaklandığını ve kalp yetmezliği tedavisinde gösterdiği üstünlüğün de bu metabolik etkisinden kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Karvedilol, bisoprolol, propranolol, kalp metabolizması, yağ asidi oksidasyonu

## 1.2. Abstract

Beta adrenergic receptor blocking drugs ( $\beta$  blockers) are used in many cardiovascular diseases such as hypertension, ischemic heart disease, and arrhythmia. Although contraindicated for heart failure in the past, some  $\beta$  blockers are successful in alleviating heart failure symptoms and reduce mortality, but they differ in their effectiveness when used in heart failure. Carvedilol, an inhibitor of both  $\alpha_1$  and  $\beta$  receptors, is superior to other  $\beta$  blockers in heart failure patients. A possible effect of  $\beta$  blockers on cardiac substrate metabolism has been suggested recently. The effects of carvedilol on myocyte substrate utilization is investigated in this study and compared with other  $\beta$  blockers. C2C12 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and differentiated in the same medium that contained 1% FBS. After validation and selection of the dose of drugs for each metabolic substrate, metabolic rates were determined of control and drug-treated cells. Carvedilol, at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , decreased long chain fatty acid oxidation rate by nearly 40% in both non-stimulated and adrenaline-stimulated cells and stimulated glycolysis accordingly. Similar results were obtained with the use of prazosine ( $\alpha_1$  blocker) but not with propranolol or bisoprolol. Based on the results of this study, the direct effects of carvedilol on substrate metabolism seem to be related to the blockade of  $\alpha_1$  adrenergic receptors. Moreover, the better performance of carvedilol in the treatment of heart failure may be the result of the effects of this drug on cardiac metabolism.

Key Words: Carvedilol, bisoprolol, propranolol, cardiac metabolism, fatty acid oxidation

## **2. Amaç ve Kapsam**

### **2. 1. Amaç**

Beta adrenerjik reseptör blokerleri ( $\beta$ -blokerler) uzun yıllardır pek çok hastalığın tedavisinde ve hastalık semptomlarının giderilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Genel olarak “ $\beta$ -blokerler” olarak adlandırılan bu büyük ilaç grubunda  $\beta$  reseptörlere ek olarak  $\alpha 1$  adrenerjik reseptörleri de bloke eden karvedilol, kalp yetmezliği tedavisinde öteki ilaçlara üstünlük göstermektedir. Bu çalışmanın birinci amacı, karvedilol’ün olası metabolik etkisini, etkinin mekanizmasını ve buna aracılık eden reseptör alttipini aydınlatmaktır. Karvedilol’ün adrenerjik  $\alpha 1$  reseptörleri bloke ederek miyosit hücrelerinde yağ asidi oksidasyonunu azaltması ve karbohidrat kullanımını artırması beklenmektedir. Karvedilol’ün bu etkisine aracılık eden reseptör alttipini belirlemek ve bu etkinin spesifik olmayan  $\beta$ -bloker kullanımı ile değil karvedilol’e özgü olarak gerçekleştiğini gösterebilmek için kullanılacak ajanlardan biri de bisoprolol’dür. Bisoprolol’ün substrat metabolizması üzerindeki doğrudan etkileri de bu çalışmada incelenecektir.

Teorik olarak, karvedilol’ün  $\beta$ -bloker etkiyle lipojenezisi baskılayarak dolaşımdaki lipidlerin miktarını azalttığı, bunun yağ asidi oksidasyonundaki azalmaya katkısının olduğu ancak karvedilol’ün asıl etkisini hücre içinde yağ asidi oksidasyonunu baskılayıp karbohidrat kullanımını artırarak gösterdiği düşünülmektedir.

Bundan sonraki çalışma, karvedilol’ün miyosit hücrelerinde gerçekleştirdiği etkinin izole kalplerde de tekrarlanması ve substrat metabolizmasını değiştirmenin kalbin fonksiyonunu nasıl etkilediğinin araştırılması olacaktır.

### **2.2. Kapsam**

Çeşitli hastalıkların tedavisinde ve semptomlarının giderilmesinde  $\beta$ -blokerler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu büyük ilaç grubunda, nonselektif olarak  $\beta$ -reseptörleri bloke edenler, sadece bir  $\beta$ -reseptör alttipini bloke edenler ve  $\beta$  reseptörlere ek olarak  $\alpha 1$  adrenerjik reseptörleri de bloke eden ajanlar bulunmaktadır. Kalp yetmezliği tedavisinde grubun öteki üyelerine kıyasla özellikle karvedilol ( $\alpha 1$ - $\beta 1,2$ ), bisoprolol ( $\beta 1$ ) ve metoprolol ( $\beta 1$ )’ün mortaliteyi azalttıkları belirlenmiştir. Çok yakın zamanda tamamlanan bir başka çalışmada (COMET, 2005) ise karvedilol’ün kardiyovasküler kaynaklı, dolaşım yetmezliğine ve felce bağlı ya da ani ölümleri engelleme yönlerinden en üstün ilaç olduğu gösterilmiştir. Karvedilol’ün üstün olduğu bir başka yön ise, bu ilacın şu ana kadar incelenmiş tüm  $\beta$ -

blokerler içinde insülin rezistansı ya da diyabet riski oluşturmayan tek ilaç olmasıdır. Hipertansiyon, kalp yetmezliği ve insülin rezistansı çoğu hastada birlikte görüldüğünden karvedilol bu etkisiyle daha çok tercih edilebilecektir. Ne var ki, ilacın etki mekanizmasını doğrudan gösteren deneysel araştırma literatürde bulunmamaktadır.

Karvedilol'ün etki mekanizmasının ilacın substrat metabolizması üzerindeki etkilerinden kaynaklanıyor olması olasıdır. Çalışmamızda, kalp hücrelerinin karvedilol etkisinde hangi enerji kaynağını (karbohidrat ya da yağ asidi) tercih ettiği ve bunun hangi reseptör alttipi ( $\alpha 1$  ya da  $\beta 1$ ) aracılığı ile gerçekleştiği incelenecektir.

Bisoprolol, kalp yetmezliğinde karvedilol'den sonra tercih edilen bir ilaçtır ve bu ilacın insülin rezistansı ya da kalbin substrat metabolizması üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Hem karvedilol'ün etkisine aracılık eden reseptörü tespit etmek ve hem de bisoprolol'ün kendi etkisini belirleyebilmek için bu çalışmada bisoprolol'ün de metabolik etkileri incelenecektir.

### III. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada C2C12 (mus musculus kaynaklı miyoblast) sürekli hücre serileri (cell line) kullanılmıştır. Hücreler, Ankara Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden satın alınmıştır.

#### 3.1. Hücre Kültürü

C2C12 hücreleri, %10 (v/v) fetal sığır serumu (FBS), 100U/ml penisilin G ve 100µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'da (Growth Medium) büyütülmüştür. Yaklaşık %80'lik akışkanlığa ulaşıldığında serum içeriği %1'e düşürülmüş ortama tekrar ekim yapılmıştır (Differentiation Medium) (PERDOMO 2004). Tüm hücrelerin miyotüp'e dönüşmesinin sağlanmasının ardından hücreler deneye alınmıştır. Yaptığımız denemeler, %1 serum içeren ortama geçiş sonrasında miyotüplere dönüşümün 10 günde tamamlandığını göstermiştir.

#### 3.2. Validasyon

Bu aşamadan sonra her bir metabolik substrat için protein miktarı/ metabolik hız testi yapılmıştır. Örneğin: Palmitik asit oksidasyon hızı için reaksiyona giren toplam hücre proteini miktarı [protein miktar tayini Bradford yöntemi (1976) ile gerçekleştirilmiştir] ile oksidasyon hızının doğru orantılı olarak değişmesi gerekmektedir. Ancak bunun gerçekleşmesinden sonra metabolik deneylere geçilmiştir.

#### 3.3. Dinlenme halindeki hücrelerde substrat metabolizması

Karvedilol, bisoprolol, propranolol ve prazosin'in tek başlarına hücrelerde metabolik etkileri incelenmiştir. Hücreler gruplandırılmıştır. Kontrol (hiçbir ilaç uygulanmamış ortamda inkübe edilmiş), karvedilol, bisoprolol, propranolol ve prazosin gruplarında ayrı ayrı palmitik asit, glikoliz ve glukoz metabolizma hızları belirlenmiş, ilaçların her bir yolağı nasıl etkilediği belirlenmiştir.

**Çalışmalarımız sırasında her pasajlamann hücrelerin substrat metabolizmasında değişikliğe neden olduğunu gözlemledik ve bu nedenle her deney setinde incelemek istediğimiz her durumun en az 4 kez yer almasını sağladık. Bir başka deyişle, örneğin 3. pasajdan sonra elde ettiğimiz kontrol glukoz oksidasyonu değeri ile 5. pasaj sonrasında elde ettiğimiz değerlerin ortalamasını almadık. Her bir deney setinde yalnızca o sette yer alan kontrol değerleri ile ilaç tedavili değerleri birbirleriyle karşılaştırdık.**



### **3.4. Adrenalinle stimüle edilen hücrelerde substrat glukoz metabolizması**

Bu çalışmada ana hipotezimiz sempatik sistemin aktive olduğu kalp yetmezliği gibi durumlarda miyositlerde yağ asidi oksidasyonunun adrenerjik reseptörler aracılığı ile artmasıdır. Sempatik sistem stimülasyonunu taklit etmek için tüm hücreler adrenalinle inkübe edilmiştir ve gruplandırılmıştır. Sadece adrenalin uygulanmış (adrenalin-kontrol) hücrelerde palmitik asit, glikoliz ve glukoz oksidasyonu hızı belirlenmiştir.

### **3.5. Yağ Asidi Oksidasyonu**

[<sup>3</sup>H]palmitik asit, yağ asidi içermeyen sığır serum albumini'ne bağlanıp 12 saat diyaliz edilmiştir. Hazırlanan bu karışım filtrasyonla sterilize edildikten sonra kültür ortamı ile seyreltilmiştir. Hücreler bu çözelti ile 2 saat muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O'ya metabolize edilen palmitik asit ile ortama eklenen [<sup>3</sup>H]palmitat uçurma metoduyla (HUGHES 1993) ayrıştırılmıştır ve <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O miktarı üzerinden palmitik asit oksidasyon hızı hesaplanmıştır.

### **3.6. Glukoz Oksidasyonu**

6 çukurlu inkübasyon kaplarının kapaklarına 1M KOH ile ıslatılmış filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Hücreler deneyden bir gün önce tripsinlenerek bu inkübasyon kaplarına ekilmiştir. Kültür ortamına sterilize edilmiş [<sup>14</sup>C]glukoz eklenmiştir. Hücreler bu çözelti ile 2 saat muamele edilmiştir. Sürenin sonunda her çukura %60'lık perklorik esit eklenmiştir. Bunun amacı, [<sup>14</sup>C]glukoz'un metabolize edilmesi ile oluşmuş ve kültür ortamı içinde bulunan <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>'yi asitleştirme ile serbest hale getirmek ve serbestleşen CO<sub>2</sub>'i alkali ile doyurulmuş filtre kağıdında bağlamaktır. Filtre kağıdında absorbe olmuş <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> miktarının standart sintilasyon sayımı ile belirlenmesiyle glukoz oksidasyon hızı hesaplanmıştır (DIMOPOULOS 2007).

### **3.7. Glikoliz**

Kültür ortamına sterilize edilmiş 5-<sup>3</sup>H(N)-glukoz eklenmiştir. Hücreler bu çözelti ile 2 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O'ya metabolize edilen glukoz ile ortama eklenen [<sup>3</sup>H]glukoz uçurma metoduyla (HUGHES 1993) ayrıştırılmıştır ve <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O miktarı üzerinden glikoliz hızı hesaplanmıştır.

### **3.8. İstatistiksel Analizler**

Elde edilen tüm veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. İki grup karşılaştırılırken Student's t-test, ikiden çok grubun yer aldığı veri serileri ise ANOVA ve

sonrasında Tukey-Kramer ile gerçekleştirilmiş ve 0.05'den küçük p değeri anlamlı kabul edilmiştir.

## **IV. ANALİZ ve BULGULAR**

### **4.1. Validasyonlar ve Ön Denemeler**

Çalışmada Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden satın alınmış C2C12 (mus musculus kaynaklı miyoblast) sürekli hücre serilerini (cell line) kullandık. Hücrelerin laboratuvarımızda oluşturduğumuz koşullarda sağlıklı ve fonksiyonel olarak yaşadıklarını her pasajlama ya da medium değişimi aşamasında faz-kontrast eklentili mikroskop altında yaptığımız incelemelerle sürekli olarak inceledik. Yaptığımız gözlemler hücrelerin belirli ve öngörebildiğimiz bir hızda çoğaldıklarını ve herhangi bir problem oluşmaksızın yaşamlarını sürdürdüklerini göstermiştir.

Projenin hazırlanması sırasında C2C12 hücrelerini %10 (v/v) at serumu ile inkübe edeceğimizi bildirmiştik. Ne var ki, hücreleri satın aldığımız kurumun ve yaptığımız araştırmalarda elde ettiğimiz bulgulara dayanarak çalışmalarımızı %10 Fetal Sığır Serumunu (FBS) ile gerçekleştirmeye karar verdik. Tüm inkübasyonlarda ortamda 100U/ml penisilin G ve 100µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'da (Growth Medium) kullandık. Literatür verilerine dayanarak inkübasyonda kullanılan FBS konsantrasyonunu %10'dan %1'e düşürmenin C2C12 miyoblast hücrelerini miyotüp'e dönüştüreceğini esas alıp çalışmalarımızı bu şekilde sürdürdük. Gerçekten de bu serum konsantrasyonu değişikliği hücrelerde miyotüp dönüşümünü sağladı. Bu dönüşümün sağlandığını gösteren şekiller ara raporda sunulmuş olduğundan burada tekrar verilmemiştir.

### **4.2. Metabolik Deneyler**

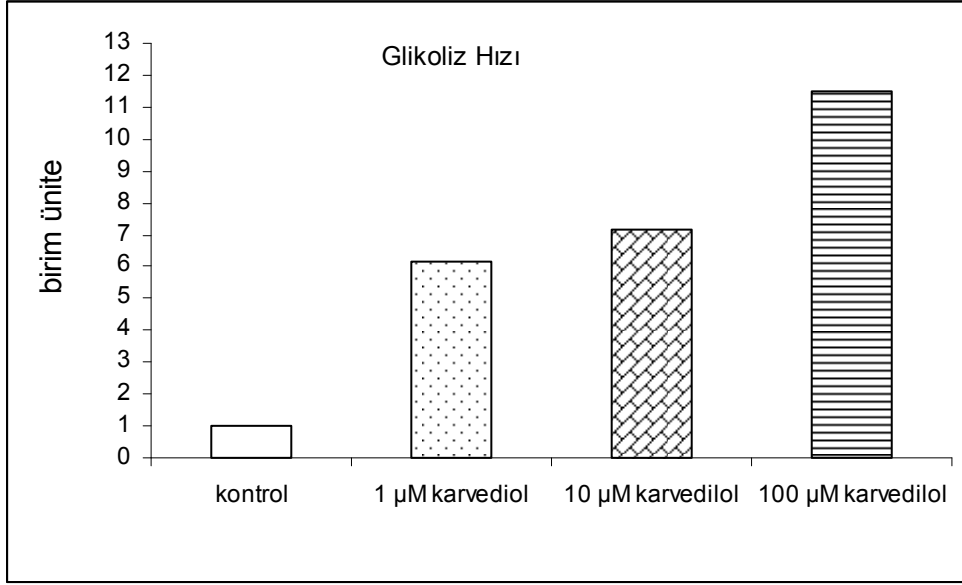
Öncelikle adrenalinle stimüle edilmemiş dinlenme halindeki hücrelerle çalıştık. Bu hücrelerde miyotüp oluşumunun 10 günde gerçekleştiğini belirledik ve bundan sonraki tüm metabolik deneyleri en az 10 gün %1 FBS içeren ortamda inkübe edilmiş hücreleri kullanarak yaptık.

### **4.3. Glikoliz Hızı**

Proje önerimizde glikoliz hızını belirlemeyi öngörmemiştik. Ne var ki, literatürü incelediğimizde glikoliz hızının glukoz kullanımının önemli bir göstergesi olduğunu gördük ve laboratuvarımızda varolan radyoaktif 5-<sup>3</sup>H(N)-glukozu kullanarak bu deneyi kolayca gerçekleştirebildik.

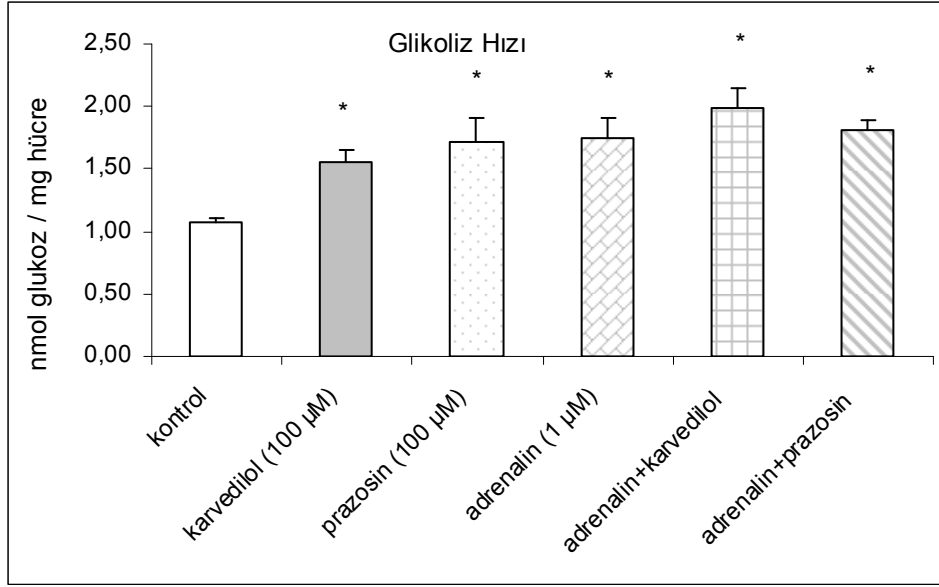
Glikoliz hızının zaman ve protein miktarına bağlı olarak değiştiğini gözlemledikten sonra, bu deneyler için toplam 2 saatlik bir inkübasyon süresi belirledik. Validasyon deneyleri sırasında ilaçları (karvedilol, bisoprolol ve propranolol) en az 3 farklı konsantrasyonda

kullanmıştık. Ne var ki, metabolik hızın pasaj sayısından etkilendiğini (söz gelimi, 3. pasajdan sonra elde ettiğimiz glikoliz hızı ile 8. pasajdan sonra ettiğimiz glikoliz hızından farklıydı) gözlemledikten sonra tüm ilaçları ve kontrolleri aynı pasajdan elde edilen hücrelerde incelemenin daha doğru olduğunu düşündük. Bu nedenle, her ilaç için tek bir konsantrasyona karar verdik ve bundan sonraki tüm incelemeleri bu konsantrasyonda ilaç kullanarak gerçekleştirdik.



**Şekil 2. Dördüncü Pasaj Sonunda Glikoliz Hızı**

Glikoliz hızı, kontrol ve belirtilen konsantrasyonlarda karvediol içeren ortamlarda belirlenmiştir. Karvediol'ün doza bağlı olarak glikoliz hızını arttırdığı gözlenmiştir. Burada, 4. pasajın sonrasında elde edilen glikoliz hızı sunulmuştur ( $n = 2-3$ ).



### Şekil 3. Glikoliz Hızı

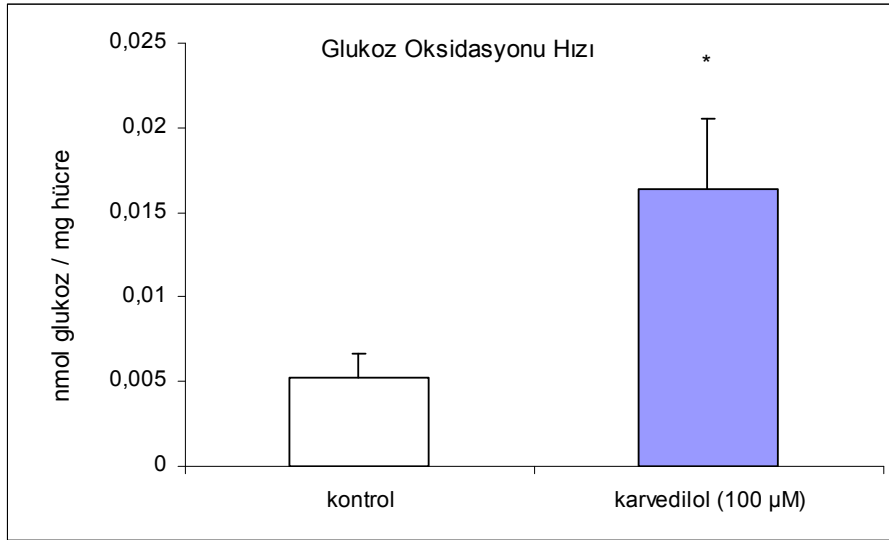
Glikoliz hızı, kontrol ve belirtilen konsantrasyonlarda karvedilol ( $\alpha 1$  ve  $\beta$  bloker), prazosin ( $\alpha 1$  bloker) ve/ya adrenalin (adrenerjik agonist) içeren ortamlarda belirlenmiştir (\* vs kontrol,  $p < 0.05$  ve  $n = 4-5$ ).

Belirlenen dozda karvedilol (100 µM), glikoliz hızını yaklaşık %50 arttırmıştır. Benzer etki, bir  $\alpha$  adrenerjik reseptör blokeri olan prazosin'le (100 µM) de gözlenmiştir. Her iki ajanın da neden oldukları artış, adrenalin'le gerçekleşen glikoliz stimülasyonuna (bkz. Tartışma/sonuç) denktir. Karvedilol ya da prazosin, glikoliz hızında adrenalin'in neden olduğu artışı daha da arttırmamışlardır.

Çalışmalarımız sırasında propranolol ( $\beta 1$  ve  $\beta 2$  bloker) veya bisoprolol'ün ( $\beta 1$  bloker) glikoliz hızını kontrollere kıyasla değiştirmedini gözlemledik ancak sonuçlarımız istatistiksel değerlendirme yapmamıza olanak vermediği için burada grafikte göstermeyi uygun bulmadık.

#### 4.4. Glukoz Oksidasyonu Hızı

Glukoz oksidasyon hızının zaman ve protein miktarına bağlı olarak değiştiğini gözlemledikten sonra, bu deneyler için toplam 2 saatlik bir inkübasyon süresi belirledik.



#### **Şekil 4. Glukoz Oksidasyonu Hızı**

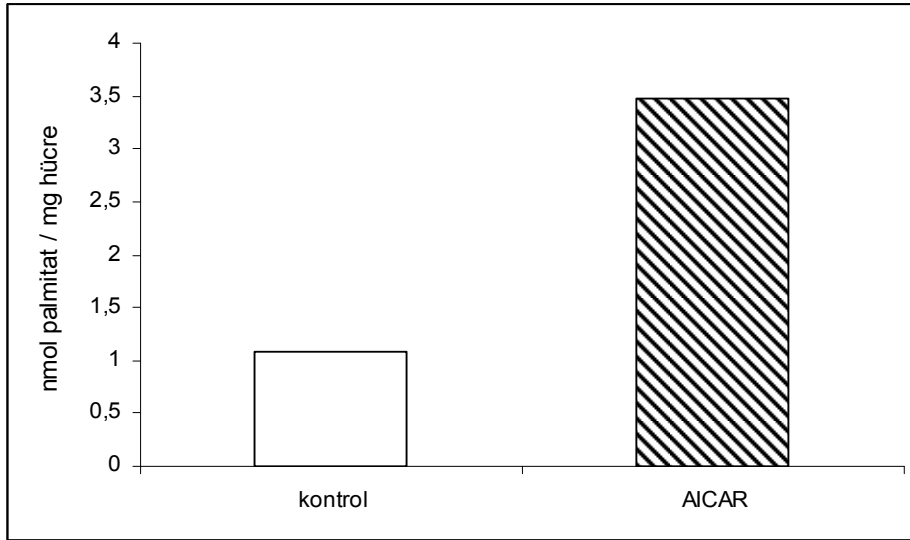
*Glukoz hızı, kontrol ve belirtilen konsantrasyonlarda karvedilol ( $\alpha$ 1 ve  $\beta$  bloker) içeren ortamlarda belirlenmiştir.*

*\* vs kontrol,  $p < 0.05$  ve  $n = 4-7$*

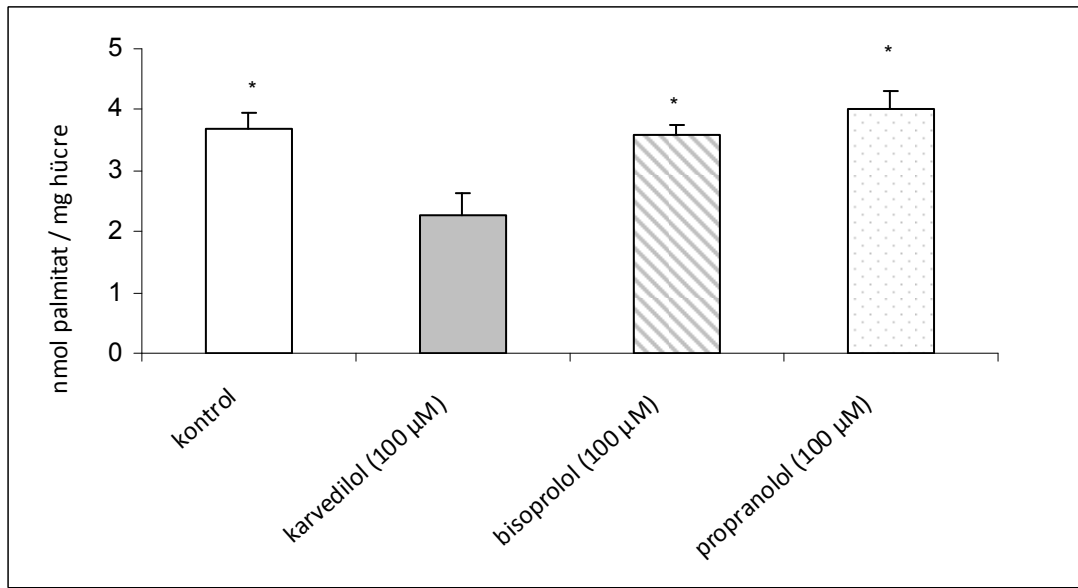
Karvedilol (100  $\mu$ M), glukoz oksidasyonunu arttırmıştır. Bu durum glikoliz hızındaki artışla birlikte değerlendirildiğinde karvedilol kullanımının hücrelerde genel olarak glukoz kullanımını arttırdığı sonucu çıkmaktadır.

#### **4.5. Palmitik Asit Oksidasyonu Hızı**

Uzun zincirli bir yağ asidi olan palmitik asidin oksidasyon hızının zaman ve protein miktarına bağlı olarak değiştiğini gözlemledikten sonra, bu deneyler için toplam 2 saatlik bir inkübasyon süresi belirledik. Bunlara ek olarak, yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı kesin olarak bilinen AICAR (5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonüklezid) ile yağ asidi oksidasyonundaki artışı gözlemledik. Bu da, sistemimizin ve ölçüm yöntemimizin güvenilirliğini bir kez daha gösterdi.



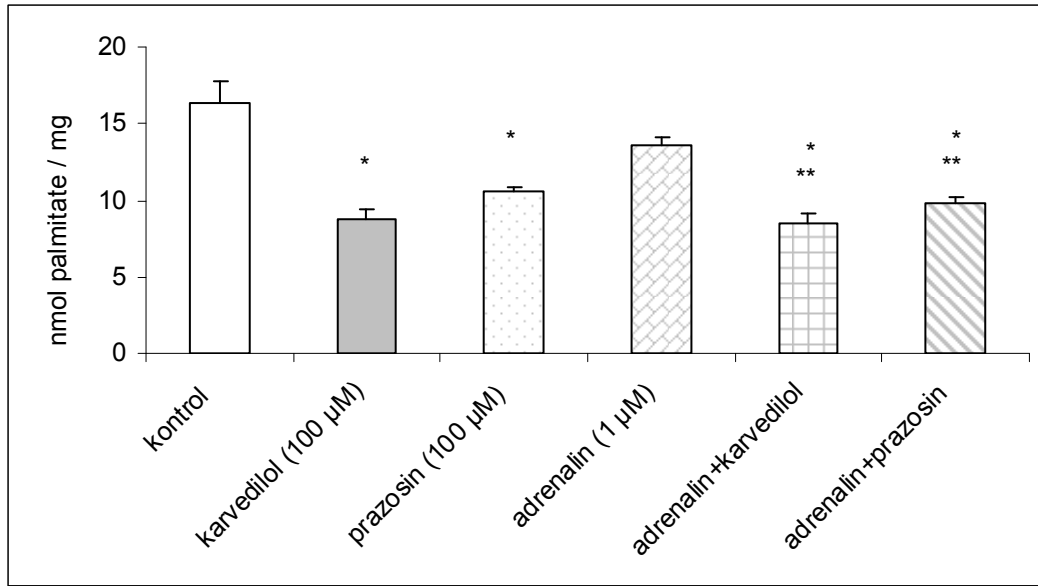
**Şekil 5. Kontrol ve AICAR içeren ortamlarda palmitik asit oksidasyon hızı**  
Palmitik asit oksidasyon hızı, kontrol ve 1 mM AICAR (n = 7, 2).



**Şekil 6. Karvedilol, Bisoprolol ve Propranololün Palmitik Asit Oksidasyonu Hızına Etkisi**  
Palmitik asit oksidasyon hızı, kontrol ve belirtilen konsantrasyonlarda karvedilol ( $\alpha$ 1 ve  $\beta$  bloker), bisoprolol ( $\beta$ 1 bloker ) ya da propranolol ( $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2 bloker) içeren ortamlarda belirlenmiştir.

\* vs karvedilol,  $p < 0.05$  ve  $n = 7$

Belirlenen dozda (100 µM), palmitik asit oksidasyonu hızını yaklaşık %50 azaltmıştır, bu etki propranolol ( $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2 bloker) ya da bisoprolol ( $\beta$ 1 bloker) ile gözlenmemiştir.



### Şekil 7. Palmitik Asit Oksidasyonu Hızı

Palmitik asit oksidasyonu hızı, kontrol ve belirtilen konsantrasyonlarda karvedilol ( $\alpha 1$  ve  $\beta$  bloker), prazosin ( $\alpha 1$  bloker ) ve/ya adrenalin (adrenerjik agonist) içeren ortamlarda belirlenmiştir

\* vs kontrol,  $p < 0.001$

\*\* vs. adrenalin,  $p < 0.01$  ve  $n = 4-5$

Belirlenen dozda karvedilol (100 µM), palmitat oksidasyonunu yaklaşık %50 azaltmıştır. Benzer etki, bir  $\alpha$  adrenerjik reseptör blokeri olan prazosinle (100 µM) de gözlenmiştir. Adrenalin, bu dozda (1 µM) palmitat oksidasyonunda artışa neden olmamıştır ve ortama adrenalinle birlikte karvedilol ya da prazosin eklenmesi yine palmitat oksidasyonunda azalma ile sonuçlanmıştır.



## V. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, hipertansiyon, aritmi, iskemik kalp hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kronik olarak kullanılmalan bazı  $\beta$ -blokerlerin kalbin enerji elde etmede kullandığı substratların kullanımını ne şekilde etkiledikleri incelenmiştir.

Çalışmanın ortaya çıkış noktası 1. ve 2. jenerasyon  $\beta$ -blokerler olarak da adlandırılan, sırasıyla selektif olmayan (örnek propranolol) ve kardiyoselektif (örnek bisoprolol)  $\beta$ -blokerlerin kronik kullanımda insülin rezistansına işaret eden çeşitli problemlere neden olmalarına karşın bir 3. jenerasyon  $\beta$ -bloker olan karvedilolün bu yönde etkisi olmadığını hatta insülin duyarlılığını arttırdığını gösteren çalışmalardır. Bunun yanısıra, yakın zaman önce tamamlanan klinik çalışmalar karvedilolün konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanıldığında yine önce jenerasyonlara kıyasla daha üstün olduğunu göstermiştir. Özetle karvedilol insülin duyarlılığını arttıran ve konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanılagelen öteki  $\beta$ -blokerlerden daha üstün bir ilaçtır.

$\beta$ -blokerlerin konjestif kalp yetmezliğinde kullanıldıklarında gözlenen düzelmenin mekanizması ya da karvedilolün öteki  $\beta$ -blokerlere üstün olmasının nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Ancak, karvedilolün insülin duyarlılığını artırıyor olması etki mekanizmasının enerjetik substat kullanımı düzeyinde olabileceğini düşündürmüştür.

Kalbin enerji elde etmede hangi substratı tercih ettiği kalp kasının performansını dramatik bir şekilde değiştirmektedir. Kalbin bu tercihi patolojik olarak değiştiğinde (diyabette olduğu gibi) ya da farmakolojik olarak modüle edildiğinde kalbin performansının da değiştiği giriş bölümünde anlatıldığı şekilde değişmektedir. Kalbi enerji elde etmek için glukoz kullanımına yönlendiren bazı ilaçların (trimetazidin ve ranolozin) örneğin iskemik kalp hastalıklarında kullanılmaları ya da varolan tedaviye eklenmelerinin tedavi sürecine pozitif etkileri olduğu kabul edilmektedir.

Varolan literatür incelendiğinde  $\beta$ -blokerlerin substrat metabolizmasını nasıl etkilediklerine ilişkin yeterli bilgiye ulaşılamamıştır (eldeki bilgiler giriş bölümünde derlenmiştir). Buradan hareketle öncelikle, konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan  $\beta$ -blokerlerden bazılarının kalp kasında enerji kaynağı olarak substratların kullanımını ne yönde değiştirdikleri incelenmiştir. Hipotez ettiğimiz gibi, karvedilol kalbin glukoz kullanımını arttırmakta ve yağ asidi kullanımını aynı oranda azaltmaktadır. Bu oranın aynı olması, karvedilolün ekstra enerjiye gereksinim duyduğu için değil sadece kullandığı enerjinin kaynağını değiştirerek etki gösterdiğini düşündürmektedir. Bu etki -yine öngördüğümüz gibi-

propranolol ya da bisoprolol kullanıldığında gözlenmemiştir ve bu da bize glukoz kullanımındaki artış ya da yağ asidi kullanımındaki azalmanın  $\alpha$  adrenerjik reseptörlerin karvedilol ile bloke edilmesinden kaynaklandığını düşündürmüştür. Nitekim,  $\alpha$  reseptör blokleri prazosin, substrat metabolizmasında karvedilolle aynı etkileri oluşturmuştur.

Glukoz kullanmada gözlediğimiz artma hücrenin sitozolünde gerçekleşen ve enerji (ATP) oluşumu için oksijen kullanılmasının gerekmediği glikoliz hızındaki artışla gösterilmiştir ve mitokondri içinde gerçekleşen glukoz oksidasyonu hızındaki artışla desteklenmiştir. Teknik bazı olanaksızlıklar nedeniyle (örneklerimizin radyoaktivite ölçümünde kullandığımız ve A.Ü. Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı bünyesinde bulunan sıvı sintilasyon ölçüm cihazının proje süremizin son ayında bozulması ve bugüne kadar tamirinin yapılamamış olması) nedeniyle glukoz oksidasyonu incelememiz öteki metabolik hız değerlendirmelerimiz kadar detaylı olamamıştır. Ancak, karvedilolün glukoz oksidasyonunu arttırdığını şüpheye yer bırakmayacak şekilde göstermiştir.

1963 yılında Randle'ın (RANDLE 1963) tanımlaması uyarınca bir hücrenin aynı düzeyde fonksiyon gerçekleştirirken kullanacağı sabit bir enerji miktarı vardır. Hangi kaynakların bu toplam miktara ne kadar katılacağı fizyolojik, patolojik ya da farmakolojik olarak belirlenir. Sözgelimi fizyolojik olarak hücre toplam miktarın %80'ini yağ asidi oksidasyonundan kalan %20'yi karbohidrat kullanımından sağlıyordur ama farmakolojik olarak bu katılım miktarları sırasıyla %75 ve %25 olarak değiştirilebilir. Eğer hücrenin yaptığı iş aynıysa, örneğin kalbin atım sayısı ve gücü aynı kalıyorsa bu değişim sadece metabolik düzenleme olarak adlandırılabilir. Ancak, kullanılan ajan kalbin yaptığı işte azalmaya neden oluyorsa ( $\beta$ -blokerlerin kalp atım sayısını azaltması gibi) o zaman gözlenen metabolik değişikliğin, fonksiyonel değişikliğin bir sonucu da olabileceği düşünülebilir. Bunun nedeni, kalbin enerji (ATP) rezervinin bulunmayışı ve ancak gereksinim duyduğu kadar enerjiyi varolan kaynakları kullanarak gereksinim duyduğu zamanda sentezlemesidir.

Bizim çalışmamızda glukoz kullanımındaki artışla (yaklaşık %50) benzer bir yağ asidi oksidasyonu düşüşü (yaklaşık %50), pozitif bir bakışla durumun Randle siklusu uyarınca gerçekleştiğini yani karvedilolün kalbin işini değil substrat metabolizmasını değiştirdiğini göstermektedir. Bu yorumun dolaylı desteği, konjestif kalp yetmezliği tedavisinde karvedilolün öteki  $\beta$ -blokerlere üstün olmasından gelmektedir. Ne var ki, bu projede elde ettiğimiz sonuçlarla bunu kesin olarak söylememiz iki nedenle olanaklı değildir: 1. Hücre kültürü tekniği kullanmamız metabolik etkinin ne olduğunu göstermek ve anlamak yönüyle çok önemli olsa da kalp fonksiyonunu değerlendirmemize olanaklı bir teknik değildir. Bunun için benzer deneylerin fonksiyon izlemeye de olanak veren izole kalp preparatlarında da

gerçekleştirilmesi gerekmektedir ve projemizin devamını öncelikle bu çalışmalar oluşturacaktır. Bu projeyi ortaya koyarken de öncelikle doğrudan metabolik etkiyi inceleyeceğimizi, pozitif sonuç bulmamız durumunda da hayvan deneylerine geçeceğimizi bildirmiştik. Bu sayede gereksiz olabilecek hayvan kullanımını da önlemiş olduk. 2. Hücrelerin endojen kaynaklarının enerji elde etmeye ne kadar katkıda bulunduğunu değerlendirmedik. Biz yalnızca eksojen substrat (hücrelere ortam içinde bizim sağladığımız karbohidrat ya da yağ asidi) kullanımını inceledik ve hücrede varolan yağ asidi ya da glukoz (TAG ve glikojen) rezervinin ne ölçüde korunduğunu değerlendirmedik. Bu deneylerde elde ettiğimiz pozitif sonuçların ışığında bu değerlendirmelerin de yapılması olasıdır. Bunu izleyen çalışmalarımızda izole kalp preparatları ve/ya elimizde bulunan hücrelerde endojen madde miktar kullanımını incelemeyi planlamaktayız.

Çalışmalarımızın bir bölümünde hücreleri adrenalinle inkübe ederek konjestif kalp yetmezliğinde gerçekleştiğini düşündüğümüz bir “hiperkatekolamin” durumu oluşturmaya çalıştık. Bu deneylerde, literatürü inceleyerek belirlediğimiz 1  $\mu$ M adrenalin kullandık. Yukarıda sözünü ettiğimiz gibi, kalp fonksiyonunu stimüle ettiği bilindiği için adrenalinin substrat kullanımını da arttırmasını bekliyorduk. Nitekim, adrenalinin glukoz kullanımını arttırdığını gözledik. Karvedilol ya da prazosin ise adrenalinin glukoz kullanımında yaptığı stimülasyonu daha da arttırmadı. Adrenalin, bilindiği gibi hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  adrenerjik reseptörleri aktive etmektedir. Bulgularımızın ışığında  $\beta$  reseptör aktivasyonunun (kalp fonksiyonun stimülasyonu) kalbe gereksinim duyduğu ekstra enerjiyi öncelikle glukoz kullanımından sağladığı ve bu reseptörlerin bloke edilmesinin ise hücreye glukoz girişini engelleyerek insülin rezistansı durumuna neden olduğunu düşünmekteyiz.

Adrenalinle inkübasyon, yağ asidi oksidasyon hızında bir değişikliğe neden olmadı ve bu hücrelerde de karvedilol ve prazosin  $\alpha$  reseptörlerin bloke edilmesi ile yağ asidi oksidasyonunu azalttı.

Bundan sonraki çalışma, karvedilol'ün miyosit hücrelerinde gerçekleştirdiği etkinin izole kalplerde de tekrarlanması ve substrat metabolizmasını karvedilolle değiştirmenin kalbin fonksiyonunu nasıl etkilediğinin araştırılması olacaktır.

## VI. KAYNAKLAR

- AL-HESAYEN A., Azevedo E.R., Floras J.S., Hollingshead S., Lopaschuk G.D., Parker J.D., Selective versus nonselective beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure: differential effects on myocardial energy substrate utilization, *Eur. J. Heart Fail.*, 7(4), 618-623, (2005).
- ASCHENBACH W.G., Brower G.L., Talmadge R.J., Dobson J.L., Gladden L.B., Effect of a myocardial volume overload on lactate transport in skeletal muscle sarcolemmal vesicles, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281, R176–R186, (2001).
- ASHRAFIAN H., Frenneaux M.P., Opie L.H., Metabolic mechanisms in heart failure, *Circulation*, 116, 434-448, (2007).
- BARGER P.M., Kelly D.P., Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms, *Am. J. Med. Sci.*, 318, 36–42, (1999).
- BELL D.S., Lukas M.A., Holdbrook F.K., Fowler M.B., The effect of carvedilol on mortality risk in heart failure patients with diabetes: results of a meta-analysis, *Curr. Med. Res. Opin.*, 22, 287–296, (2006).
- BOUZAMONDO A., Hulot J.S., Sanchez P., Lechat P., Beta-blocker benefit according to severity of heart failure, *Eur. J. Heart Fail.*, 5, 281–289, (2003).
- BRADFORD M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, (1976).
- BRINDLE N.P., Ontko J.A., Alpha-adrenergic suppression of very-low-density-lipoprotein triacylglycerol secretion by isolated rat hepatocytes, *Biochem. J.*, 250, 363-368, (1988).
- BRINDLE N.P., Ontko J.A., Suppression of triglyceride secretion by epinephrine in isolated rat hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141, 191-197, (1986).
- BROPHY J.M., Joseph L., Rouleau J.L., Beta-blockers in congestive heart failure. A Bayesian meta-analysis, *Ann. Intern. Med.*, 134, 550–560, (2001).
- CHANDLER M.P., Kerner J., Huang H., Vazquez E., Reszko A., Martini W.Z., Hoppel C.L., Imai M., Rastogi S., Sabbah H.N., Stanley W.C., Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 287, H1538–H1543, (2004).
- CIBIS Investigators and Committees, The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). A randomized trial of beta-blockade in heart failure, *Circulation*, 90,1765-73, (1994).
- CIBIS-II Investigators and Committees, The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial, *Lancet*, 353, 9–13, (1999).
- DAVILA-ROMAN V.G., Vedala G., Herrero P., de las F.L., Rogers J.G., Kelly D.P., Gropler R.J., Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 40, 271–277, (2002).
- DIMOPOULOS N., Watson M., Green C., Hundal H.S., The PPARdelta agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells, *FEBS Lett*, 581, 24, 4743-4748, (2007).
- DULIN B.R., Haas S.J., Abraham W.T., Krum H., Do elderly systolic heart failure patients benefit from beta blockers to the same extent as the non-elderly? Meta-analysis of >12,000 patients in large-scale clinical trials, *Am. J. Cardiol.*, 95, 896–898, (2005).

DZEJA P.P., Pucar D., Redfield M.M., Burnett J.C., Terzic A., Reduced activity of enzymes coupling ATP-generating with ATP-consuming processes in the failing myocardium, *Mol. Cell. Biochem.*, 201, 33–40, (1999).

Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF), *Lancet*, 353, 2001–2007, (1999).

GRESS T.W., Nieto F.J., Shahar E., Wofford M.R., Brancati F.L., Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus, Atherosclerosis Risk in Communities Study, *N. Engl. J. Med.*, 342, 905-912, (2000).

HAAS S.J., Vos T., Gilbert R.E., Krum H., Are beta-blockers as efficacious in patients with diabetes mellitus as in patients without diabetes mellitus who have chronic heart failure? A meta-analysis of large-scale clinical trials, *Am. Heart J.*, 146, 848–853, (2003).

HOFFMAN B.B., Adrenoceptor Antagonist Drugs. In: *Basic & Clinical Pharmacology*, ed: BG Katzung., Vol:10, McGraw Hill, (2007). P: 141-158.

HUGHES S.D., Quaade C., Johnson J.H., Ferber S., Newgard C.B., Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion, Relationship to glucose metabolism, *J. Biol. Chem.*, 268, 15205-15212, (1993).

IEMITSU M., Miyauchi T., Maeda S., Tanabe T., Takanashi M., Irukayama-Tomobe Y., Sakai S., Ohmori H., Matsuda M., Yamaguchi I., Aging-induced decrease in the PPAR-alpha level in hearts is improved by exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283, H1750–H1760, (2002).

JACOB S., Rett K., Wicklmayr M., Agrawal B., Augustin H.J., Dietze G.J., Differential effect of chronic treatment with two beta-blocking agents on insulin sensitivity: the carvedilol-metoprolol study, *J. Hypertens.*, 14, 489-494, (1996).

JOHANNSSON E., Lunde P.K., Heddle C., Sjaastad I., Thomas M.J., Bergersen L., Halestrap A.P., Blackstad T.W., Ottersen O.P., Sejersted O.M., Upregulation of the cardiac monocarboxylate transporter MCT1 in a rat model of congestive heart failure, *Circulation*, 104, 729–734, (2001).

KOSTIS J.B., Sanders M., The association of heart failure with insulin resistance and the development of type 2 diabetes, *Am. J. Hypertens.*, 18, 731-737, (2005).

KRUM H., Haas S.J., Eichhorn E., Ghali J., Gilbert E., Lechat P., Packer M., Roecker E., Verkenne P., Wedel H., Wikstrand J., Prognostic benefit of beta-blockers in patients not receiving ACE-inhibitors, *Eur. Heart J.*, 26, 2154–2158, (2005).

LECHAT P., Packer M., Chalon S., Cucherat M., Arab T., Boissel J.P., Clinical effects of beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials, *Circulation*, 98, 1184–1191, (1998)

LEI B., Lionetti V., Young M.E., Chandler M.P., D' Agostino C., Kang E., Altarejos M., Matsuo K., Hintze T.H., Stanley W.C., Recchia F.A., Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 36, 567–576, (2004).

LITHELL H., Pollare T., Vessby B., Metabolic effects of pindolol and propranolol in a double-blind cross-over study in hypertensive patients, *Blood Press.*, 1, 92-101, (1992).

MARTIN M.A., Gomez M.A., Guillen F., Bornstein B., Campos Y., Rubio J.C., de la Calzada C.S., Arenas J., Myocardial carnitine and carnitine palmitoyltransferase deficiencies in patients with severe heart failure, *Biochim. Biophys. Acta*, 1502, 330–336, (2000).

- MIYAMOTO T., Takeishi Y., Tazawa S., Inoue M., Aoyama T., Takahashi H., Arimoto T., Shishido T., Tomoike H., Kubota I., Fatty acid metabolism assessed by <sup>125</sup>I-iodophenyl 9-methylpentadecanoic acid (9MPA) and expression of fatty acid utilization enzymes in volume-overloaded hearts, *Eur. J. Clin. Invest.*, 34, 176–181, (2004).
- NIKOLAIDIS L.A., Sturzu A., Stolarski C., Elahi D., Shen Y.T., Shannon R.P., The development of myocardial insulin resistance in conscious dogs with advanced dilated cardiomyopathy, *Cardiovasc. Res.*, 61, 297–306, (2004).
- OBERHAENSLI R.D., Schwendimann R., Keller U., Effect of norepinephrine on ketogenesis, fatty acid oxidation, and esterification in isolated rat hepatocytes, *Diabetes*, 34, 774-779, (1985).
- OSORIO J.C., Stanley W.C., Linke A., Castellari M., Diep Q.N., Panchal A.R., Hintze T.H., Lopaschuk G.D., Recchia F.A., Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure, *Circulation*, 106, 606–612, (2002).
- PACKER M., Bristow M.R., Cohn J.N., Colucci W.S., Fowler M.B., Gilbert E.M., Shusterman N.H., The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure, U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 334, 1349-1355, (1996).
- PACKER M., Coats A.J., Fowler M.B., Katus H.A., Krum H., Mohacsi P., Rouleau J.L., Tendera M., Castaigne A., Roecker E.B., Schultz M.K., DeMets D.L., Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure, *N. Engl. J. Med.*, 344, 1651-1658, (2001).
- PACKER M., Fowler M.B., Roecker E.B., Coats A.J., Katus H.A., Krum H., Mohacsi P., Rouleau J.L., Tendera M., Staiger C., Holcslaw T.L., Amann-Zalan I., DeMets D.L., Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study, *Circulation*, 106, 2194–2199, (2002).
- PAOLISSO G., Gambardella A., Galzerano D., D'Amore A., Rubino P., Verza M., Teasuro P., Varricchio M., Onofrio F., Total body and myocardial substrate oxidation in congestive heart failure, *Metabolism*, 43, 174–179, (1994).
- PERDOMO G., Commerford S.R., Richard A.M., Adams S.H., Corkey B.E., O'Doherty R.M., Brown N.F., Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation, *J. Biol. Chem.* 279, 27177-27186, (2004).
- POLLARE T., Lithell H., Morlin C., Prantare H., Hvarfner A., Ljunghall S., Metabolic effects of diltiazem and atenolol: results from a randomized, double-blind study with parallel groups, *J. Hypertens.* 7, 551-559, (1989). (1)
- POLLARE T., Lithell H., Selinus I., Berne C., Sensitivity to insulin during treatment with atenolol and metoprolol: a randomised, double blind study of effects on carbohydrate and lipoprotein metabolism in hypertensive patients, *B.M.J.*, 298, 1152-1157, (1989). (2)
- POOLE-WILSON P.A., Cleland J.G., Di Lenarda A., Hanrath P., Komajda M., Metra M., Remme W., Swedberg K., Torp-Pedersen C., Rationale and design of the carvedilol or metoprolol European trial in patients with chronic heart failure: COMET, *Eur. J. Heart Fail.*, 4, 321-329, (2002).

POOLE-WILSON P.A., Swedberg K., Cleland J.G., Di Lenarda A., Hanrath P., Komajda M., Lubsen J., Lutiger B., Metra M., Remme W.J., Torp-Pedersen C., Scherhag A., Skene A., Carvedilol Or Metoprolol European Trial Investigators. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial, *Lancet*, 362, 7-13, (2003).

RANDLE P.J., Garland P.B., Hales C.N., Newsholme E.A., The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus, *Lancet*, 1, 785–789, (1963).

RAZEGHI P., Young M.E., Alcorn J.L., Moravec C.S., Frazier O.H., Taegtmeier H., Metabolic gene expression in fetal and failing human heart, *Circulation*, 104, 2923–2931, (2001).

RECCHIA F.A., McConnell P.I., Bernstein R.D., Vogel T.R., Xu X., Hintze T.H., Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog, *Circ. Res.*, 83, 969–979, (1998).

REMONDINO A., Rosenblatt-Velin N., Montessuit C., Tardy I., Papageorgiou I., Dorsaz P.A., Jorge-Costa M., Lerch R., Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 32, 2025–2034, (2000).

ROSENBLATT-VELIN N., Montessuit C., Papageorgiou I., Terrand J., Lerch R., Postinfarction heart failure in rats is associated with upregulation of GLUT-1 and downregulation of genes of fatty acid metabolism, *Cardiovasc. Res.*, 52, 407–416, (2001).

SACK M.N., Rader T.A., Park S., Bastin J., McCune S.A., Kelly D.P., Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart, *Circulation*, 94, 2837-2842, (1996).

SACK M.N., Harrington L.S., Jonassen A.K., Mjos O.D., Yellon D.M., Coordinate regulation of metabolic enzyme encoding genes during cardiac development and following carvedilol therapy in spontaneously hypertensive rats, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 14, 31-39, (2000).

SAMUELSSON O., Hedner T., Berglund G., Persson B., Andersson O.K., Wilhelmsen L., Diabetes mellitus in treated hypertension: incidence, predictive factors and the impact of non-selective beta-blockers and thiazide diuretics during 15 years treatment of middle-aged hypertensive men in the Primary Prevention Trial, *J. Hum. Hypertens.*, 8, 257-263, (1994).

SHEKELLE P.G., Rich M.W., Morton S.C., Atkinson C.S., Tu W., Maglione M., Rhodes S., Barrett M., Fonarow G.C., Greenberg B., Heidenreich P.A., Knabel T., Konstam M.A., Steimle A., Warner Stevenson L., Efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers in the management of left ventricular systolic dysfunction according to race, gender, and diabetic status: a meta-analysis of major clinical trials, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41, 1529–1538, (2003).

STANLEY W.C., Lopaschuk G.D., Hall J.L., McCormack J.G., Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions., *Cardiovasc. Res.*, 33, 243-257, (1997).

STARK B., Keller U., Alpha 1-adrenergic stimulation of ketogenesis and fatty acid oxidation is associated with inhibition of lipogenesis in rat hepatocytes, *Experientia*, 43, 1104-1106, (1987).

SWEDBERG K., Hjalmarson A., Waagstein F., Wallentin I., Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade, *Lancet*, 1, 1374-1376, (1979).

TAYLOR M., Wallhaus T.R., DeGrado T.R., Russell D.C., Stanko P., Nickles R.J., Stone C.K., An evaluation of myocardial fatty acid and glucose uptake using PET with [<sup>18</sup>F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid, *J. Nucl. Med.*, 42, 55–62, (2001).

TORP-PEDERSEN C., Poole-Wilson P.A., Swedberg K., Cleland J.G., Di Lenarda A., Hanrath P., Komajda M., Lutiger B., Metra M., Remme W.J., Scherhag A., Skene A.; COMET Investigators. Effects of metoprolol and carvedilol on cause-specific mortality and morbidity in patients with chronic heart failure—COMET, *Am. Heart J.*, 149, 370-376, (2005).

WAAGSTEIN F., Bristow M.R., Swedberg K., Camerini F., Fowler M.B., Silver M.A., Gilbert E.M., Johnson M.R., Goss F.G., Hjalmarson A., Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group, *Lancet*, 342, 1441-1446, (1993).

WAAGSTEIN F., Hjalmarson A., Varnauskas E., Wallentin I., Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy, *Br. Heart J.*, 37, 1022-1036, (1975).

WALHAUSS T.R., Taylor M., DeGrado T.R., Russell D.C., Stanko P., Nickles R.J., Stone C.K., Myocardial free fatty acid and glucose use after carvedilol treatment in patients with congestive heart failure, *Circulation*, 103, 2441, (2001).

YAZAKI Y., Isobe M., Takahashi W., Kitabayashi H., Nishiyama O., Sekiguchi M., Takemura T., Assessment of myocardial fatty acid metabolic abnormalities in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy using 123I BMIPP SPECT: correlation with clinicopathological findings and clinical course, *Heart*, 81, 153–159, (1999).



## VII. EKLER

### a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Bu proje, TÜBİTAK-SBAG tarafından da desteklenmiş ve harcamalarının önemli bir bölümü TÜBİTAK bütçesinden karşılanmıştır. Proje çalışmaları sırasında gereksinim duyulduğu halde satın alınmamış olan mikroskop ise bu BAP projesi bütçesi sayesinde laboratuvara kazandırılmıştır.

### b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Bu proje kapsamında temin edilene kadar hücrelerin incelenmesi için Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan mikroskop kullanılmıştır. Ancak, hücrelerin her inceleme sırasında (en geç 3 günde bir kez) izole olarak korundukları temiz oda koşullarından çıkarılıp başka bir laboratuvara taşınmaları gerektiğinden hücrelerde kontaminasyon ortaya çıkmıştır.

Proje sayesinde hücre kültürü laboratuvarımızın temel gereksinimi olan inverted mikroskop alınmış ve deneylerin sağlıklı bir şekilde tamamlanmaları mümkün olabilmektedir. Bundan sonraki hücre kültürü çalışmalarının tümü kendi laboratuvarımız içinde tamamlanabilecektir.

Bu çalışma, laboratuvarımızda gerçekleştirilen ve hücre kültürü temeline dayanan ilk çalışmadır.

### c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

Kesim III'de detaylandırılmıştır

### d) Sunumlar

1. Onay-Besikci, A., Süzmeçelik, E., İrat, A.M., Özçelikay, T. *The Effects of Carvedilol on Substrate Metabolism in C2C12 Cells*. Heart Failure 2009, 30 May – 2 June 2009 – Nice, France (POSTER)
2. Onay-Besikci, A., Süzmeçelik, E., İrat, A.M., Özçelikay, T. *Carvedilol Suppresses Fatty Acid Oxidation in C2C12 Cells*. The 7th Annual Scientific Sessions of the Society for Heart and Vascular Metabolism 2009, August 23 – 26 - Padova, Italy (POSTER)