



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KARVEDİLOLÜN METABOLİK VE  
KARDİYOVASKÜLER ETKİLERİNE BETA-  
ARRESTİNLERİN KATKISININ İNCELENMESİ**

**Berna GÜVEN**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Arzu ONAY BEŞİKÇİ**

**ANKARA  
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARVEDİLOLÜN METABOLİK VE**  
**KARDİYOVASKÜLER ETKİLERİNE BETA-**  
**ARRESTİNLERİN KATKISININ İNCELENMESİ**

**Berna GÜVEN**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Arzu ONAY BEŞİKCİ**

**Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 17H0237004 numaralı ve TÜBİTAK'ın 217S961 numaralı projeleri ile desteklenmiştir.**

**ANKARA**  
**2019**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Karvedilolün Metabolik ve Kardiyovasküler Etkilerine Beta-Arrestinlerin Katkısının İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Berna Güven

Tarih:

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında Berna GÜVEN  
tarafından hazırlanan “Karvedilolün Metabolik ve Kardiyovasküler Etkilerine  
Beta-Arrestinlerin Katkısının İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri  
tarafından doktora tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23.12.2019

Prof. Dr. Bülent GÜMÜŞEL  
Lokman Hekim Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Arzu BEŞİKÇİ  
Ankara Üniversitesi  
Raportör

Prof. Dr. Serap GÜR  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Mustafa ARK  
Gazi Üniversitesi  
Üye

Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN  
Ankara Üniversitesi  
Üye

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

Prof. Dr. Mehmet AKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	ii
Şekiller	vi
Çizelgeler	vii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. G-Proteini ile Kenetli Reseptörler ve Desensitizasyon	3
1.1.1. G-Proteini ile Kenetli Reseptör Fizyolojisi	3
1.1.2. $\beta$ Arrestin Proteinleri ve Desensitizasyon	5
1.1.2.1. Desensitizasyon	5
1.1.2.2. ERK Aktivasyonu	6
1.1.2.3. $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Diğer Sinyalleri	9
1.3. G-Protein Kenetli Reseptörlerde <i>Biased</i> Agonizma	11
1.3.1. <i>Biased</i> Agonizma Tanımı	11
1.3.2. Barkod Hipotezi	13
1.3.3. <i>Biased</i> Sinyalin Koruyucu Etkileri	14
1.4. Kardiyovasküler İlaçların Hedefi Olarak Adrenerjik Reseptörler	15
1.4.1. Karvedilolün Kardiyovasküler İlaçlar İçindeki Yeri	16
1.4.2. Bir <i>Biased</i> Agonist Olarak Karvedilol	18
1.5. Kardiyak Fonksiyon Bozukluklarında $\beta$ Arrestinlerin Rolü	21
1.5.1. Kalp Yetmezliği	21
1.5.2. Diyabetik Kardiyomiyopati	23
1.6. Kalpte Substrat Metabolizması	24
1.6.1. Karbohidrat Metabolizması	25
1.6.2. Yağ Asidi Metabolizması	26
1.6.3. Randle Döngüsü ve Bu Döngünün Tedavideki Yeri	30
1.7. Diyabetik Kardiyomiyopatide Görülen Metabolik Bozukluklar	31
1.8. $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Metabolik Etkileri	33
1.9. Mitokondriyal Biyojenez	36
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>40</b>
2.1. Kullanılan Gereçler	40
2.1.1. Malzemeler	40
2.1.2. Kimyasal Maddeler	41
2.1.3. Antikorlar	43
2.2. Sıçanlarda Gerçekleştirilen Çalışmalar	43
2.2.1. Kalp Atım Hızı ve Kan Basıncı Parametrelerinin Ölçülmesi	45
2.2.2. Langendorff Yöntemi ile Kalp Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi	46
2.2.3. $\beta$ Arrestin 1, $\beta$ Arrestin 2 ve ERK Miktar Tayinleri	47

2.2.4. Substrat Metabolizmasında Görev Alan Biyokimyasal Yolakların ve Proteinlerin İncelenmesi	48
2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	49
2.3.1. $\beta$ Arrestin 1 ve $\beta$ Arrestin 2 Proteinlerinin Susturulması ve Bunun Doğrulanması	50
2.3.2. Karvedilol ve $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Substrat Metabolizmasına Etkisinin Değerlendirilmesi	51
2.3.3. Karvedilol ve $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Mitokondriyal Biyojeneze Etkisinin Değerlendirilmesi	52
2.4. Western Blot	52
2.5. İstatistiksel Analizler	55
2.6. Yazım ve Grafiklerin Oluşturulması	55
<b>3. BULGULAR</b>	<b>56</b>
3.1. Sıçanların Genel Özellikleri	56
3.2. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Üzerine Etkisi	57
3.3. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin Bazal Kardiyak Parametreler Üzerine Etkileri	58
3.4. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin İzoproterenol Yanıtlarına Etkisi	60
3.5. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin $\beta$ Arrestin Proteinleri Üzerine Etkisi	62
3.6. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin ERK Aktivasyonu Üzerine Etkisi	64
3.7. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin Yağ Asidi Kullanımı Üzerine Etkisi	65
3.8. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin Glukoz Kullanımı Üzerine Etkisi	67
3.8.1. Glikoliz Enzimlerinin Aktivitesi	67
3.8.2. Glukoz Taşıyıcı Proteinlerin Seviyeleri	69
3.9. C2C12 Hücrelerinde Karvedilol ve Adrenalinin ERK Aktivasyonu Üzerindeki Etkileri	70
3.10. C2C12 Hücrelerinde $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Susturulmasının Doğrulanması	71
3.11. C2C12 Hücrelerinde Karvedilol ve Adrenalinin G-proteini Aracılı İkincil Ulaklar Üzerine Etkileri	73
3.12. C2C12 Hücrelerinde $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Susturulmasının Substrat Metabolizmasında Rolü Olan Proteinlere Etkisi	74
3.12.1. Yağ Asidi Kullanımına Etkisi	74
3.12.2. Glukoz Kullanımına Etkisi	75
3.13. C2C12 Hücrelerinde $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Susturulmasının Mitokondriyal Biyojeneze Rolü Olan Proteinlere Etkisi	76
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>78</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>85</b>
<b>ÖZET</b>	<b>87</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>88</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>89</b>
<b>EKLER</b>	<b>108</b>
Ek.1. Etik Kurul Onay Raporu	108
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>109</b>

## ÖNSÖZ

Karvedilol; kalp yetmezliği ve hipertansiyon tedavisi ile miyokard infarktüs sonrasında gelişen ventriküler fonksiyon bozukluklarının engellenmesinde kullanılan üçüncü kuşak bir beta ( $\beta$ )-blokördür. Kronik kullanımda diğer  $\beta$ -blokörlerden farklı olarak insülin rezistansı ya da diyabet gibi metabolik bozukluklara yol açmamaktadır. Beta arrestin proteinlerinin karvedilolün hücre içinde oluşturduğu sinyalizasyona aracılık ettiği gösterilmiştir. Adrenerjik reseptörleri antagonize ederken  $\beta$  arrestinler aracılığı ile hücrede agonist-benzeri etkiler gösteren karvedilol, artık bir *biased* agonist olarak adlandırılmaktadır. Beta arrestin proteinleri ile metabolik hastalıklar arasında bir ilişki olması, karvedilolün de kardiyovasküler ve metabolik etkilerine bu proteinlerin katkıda bulunuyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında, karvedilolün metabolik etkilerini ve bu etkilerin mekanizmasını tespit etmek, karvedilolün metabolik etkilerine  $\beta$  arrestin proteinlerinin katkısını incelemek, deneysel diyabet modeli kullanılarak karvedilolün diyabetik hasarı tedavi edici etkisini değerlendirmek ve  $\beta$  arrestin proteinlerinin diyabetten ve karvedilol tedavisinden nasıl etkilendiklerini belirlemek amaçlanmıştır. Sonuç olarak karvedilolün diyabetik kalpteki fonksiyonel bozukluğu iyileştirdiği ve bu iyileşmeye substrat metabolizması üzerindeki yararlı etkilerinin katkısı olduğu tespit edilmiştir. Metabolizma üzerindeki bu etkilere de  $\beta$  arrestin proteinlerinin aracılık ettiği gösterilmiştir. Bu çalışma, karvedilolün kardiyovasküler ve metabolik etkilerinin mekanizmasının ve  $\beta$  arrestin proteinlerinin neden oldukları fizyolojik etkileri aydınlatılmasına aracılık ederek öteki reseptörlerle etkileşimsiz yalnızca  $\beta$  arrestin proteinlerini hedefleyen yeni moleküllerin, metabolik hastalıklarda kullanılabilmesine aracılık edecektir.

TÜBİTAK tarafından desteklenen bu çalışma Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Yalnızca akademik kariyerimin bu ilk adımında değil hayatın her alanında bana yol gösteren, sorumluluk almayı ve en büyük çıkmazda bile keyifle problemlerle başa çıkabilmeyi kendisinden öğrendiğim, iyi bir bilim insanı olma konusunda örnek aldığım danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Arzu Beşikci'ye,

Tecrübe ve bilgilerini her zaman cömertçe benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan ve Dr. Öğr. Üyesi Işıl Özakca Gündüz'e,

Tezimin her aşamasında yardımları ve çözüm önerileriyle hayatımı kolaylaştıran, aklına her zaman güvendiğim kıymetli arkadaşım Ecz. Zümra Kara'ya,

Desteklerini benden hiç esirgemeyen ve ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan arkadaşlarım Dr. Didem Yılmaz Oral, Ecz. İrem Karaömerlioğlu, Ecz. Betül Erdoğan, Ecz. Elif Müderrisoğlu, Ecz. Zeynep Elif Yeşilyurt ve Ecz. Heba Asker'e,

Beni yetiştirip bugünlere getiren, her tercihimin saygıyla karşılayan ve hep arkamda olan annem, babam ve abime,

Proje desteğinden (17H0237004) ötürü Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne

Doktora süreci boyunca sağladıkları burs (2211A-Genel Yurt içi Doktora Burs Program) ve proje desteği (SBAG-217S961) sebebiyle TÜBİTAK'a;

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

7-TMR	7-Transmembranal Reseptör
$\alpha$	Alfa
AMPK	Adenozin Monofosfat ile Aktive Olan Protein Kinaz ( <i>Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase</i> )
APS	Amonyum Persülfat
AR	Adrenerjik Reseptör
ATP	Adenozin Trifosfat ( <i>Adenosine Triphosphate</i> )
$\beta$	Beta
$\beta$ arr	$\beta$ arrestin
BCA	Bikinkoninik Asit ( <i>Bicinchoninic Acid</i> )
BSA	Sığır Serum Albumini ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat ( <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> )
CD36	Yağ Asidi Taşıyan Protein ( <i>Cluster of Differentiation 36</i> )
CPT	Karnitin Palmitoil Transferaz ( <i>Carnitine Palmitoyltransferase</i> )
DAG	Diaçil Gliserol ( <i>Diacylglycerol</i> )
DAGK	Diaçil Gliserol Kinaz ( <i>Diacylglycerol Kinase</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
+dp/dt	Sol Ventrikül Kasılma Hızı
-dp/dt	Sol Ventrikül Gevşeme Hızı
ECL	Artırılmış Kemilüminesans ( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )

EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
ELISA	İmmünoenzimatik Yöntem ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
ERK	Ekstrasellüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz ( <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> )
FABP	Yağ Asidi Bağlayan Protein ( <i>Fatty Acid-Binding Protein</i> )
FADH	Flavin Adenin Dinükleotid
FBS	Fetal Sığır Serumu ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu ( <i>U.S. Food and Drug Administration</i> )
$\gamma$	Gama
G <sub>12/13</sub>	G-proteini alt tipi
GDP	Guanozin Difosfat ( <i>Guanosine Diphosphate</i> )
G <sub>i</sub>	G-proteini alt tipi
GLP	Glukagon Benzeri Peptid ( <i>Glukagon Like Peptide</i> )
GLUT	Glukoz Taşıyıcı Protein
GPCR	G-protein Kenetli Reseptör ( <i>G-protein Coupled Receptor</i> )
G <sub>q</sub>	G-proteini alt tipi
GRK	G-Protein Reseptör Kinaz ( <i>G-Protein Receptor Kinase</i> )
Gs	G-proteini alt tipi
GTP	Guanozin Trifosfat ( <i>Guanosine Triphosphate</i> )
HK	Hekzokinaz ( <i>Hexokinase</i> )
HRP	<i>Horseradish</i> Peroksidaz
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü ( <i>Insulin Like Growth Factor</i> )

IP3	İnozitol-3-Fosfat ( <i>Inositol Trisphosphate</i> )
i.p	İntraperitoneal
JNK	c-Jun N-terminal Kinaz
LDH	Laktat Dehidrojenaz ( <i>Lactate Dehydrogenase</i> )
LVDP	Sol Ventrikül İçi Gelişen Basınç ( <i>Left Ventricular Developed Pressure</i> )
LVEDP	Sol Ventrikül Diyastol Sonu Basıncı ( <i>Left Ventricular End Diastolic Pressure</i> )
MAPK	Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinazlar ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )
MEK	Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz, ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i> )
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NRF	Nükleer Solunum Faktörü ( <i>Nuclear Respiratory Factor</i> )
PBS	Fosfat Tamponlu Salin ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PDE	Fosfodiesteraz ( <i>Phosphodiesterase</i> )
PDH	Pirüvat Dehidrojenaz ( <i>Pyruvate Dehydrogenase</i> )
PFK	Fosfofruktokinaz ( <i>Phosphofructokinase</i> )
PGC1 $\alpha$	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör Gama Koaktivatör 1- Alfa ( <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gama Coactivator 1- Alpha</i> )
PI3K	Fosfoinozotid-3-Kinaz ( <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> )
PK	Pirüvat Kinaz ( <i>Pyruvate kinase</i> )

PKA	Protein Kinaz A ( <i>Protein Kinase A</i> )
PKB	Protein Kinaz B ( <i>Protein Kinase B</i> )
PKC	Protein Kinaz C ( <i>Protein Kinase C</i> )
PLC	Fosfolipaz C ( <i>Phospholipase C</i> )
PPAR $\alpha$	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör Alfa ( <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha</i> )
PPAR $\gamma$	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör Gama ( <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gama</i> )
PVDF	Polivinilidin Florür
Raf-1	Proto-onkojenik Serin-Treonin Protein Kinaz ( <i>Proto-oncogene Serine/Threonine Protein Kinase</i> )
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon Tampon Çözeltilisi ( <i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i> )
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SERCA	Sarkoplazmik Retikulum Kalsiyum ATPaz
siRNA	Susturucu Ribonükleik Asit
Src	Proto-onkojenik Tirozin Kinaz ( <i>Proto-oncogene Tyrosine Protein Kinase</i> )
STZ	Streptozotosin
TBS	Trisle Tamponlanmış Salin ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TCA	Trikarboksilik Asit Döngüsü/Sitrik Asit Döngüsü ( <i>Tricarboxylic Acid Cycle</i> )
TEMED	Tetrametiletildiamin
TFAM	Mitokondriyal Transkripsiyon Faktörü-A
TG	Tris/Glisin
TNF	Tümör Nekroz Faktör
tg	Transjenik
TGS	Tris/ Glisin/ SDS

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. G-proteininin Aktivasyonu	4
Şekil 1.2. Adrenerjik G-proteini Kenetli Reseptörlerde Sinyal İletimi	5
Şekil 1.3. $\beta$ arrestin-aracılı Sinyalizasyonlar	10
Şekil 1.4. GPCR'lerde <i>Biased</i> Agonizma.	12
Şekil 1.5. Karbohidrat Metabolizması	26
Şekil 1.6. Yağ Asidi Metabolizması	29
Şekil 1.7. Randle Döngüsü.	31
Şekil 1.8. Mitokondriyal Biyojenez	37
Şekil 2.1. Sıçanlarda Gerçekleştirilen İşlemler	44
Şekil 2.2. Kalbin Langendorff Sistemine Takılması.	47
Şekil 3.1. Sıçanların Genel Özellikleri	57
Şekil 3.2. Bazal Kalp Parametreleri.	59
Şekil 3.3. İzoproterenol ile Elde Edilen Yanıtlar.	61
Şekil 3.4. $\beta$ arrestin 1 ve $\beta$ arrestin 2 Protein Miktarı.	63
Şekil 3.5. Sol Ventrikülde ERK Fosforilasyonu.	64
Şekil 3.6. Yağ Asidi Metabolizmasında Görev Alan Proteinler.	66
Şekil 3.7. Glikoliz Enzimlerinin Aktiviteleri.	68
Şekil 3.8. Glukoz Taşıyıcı Proteinler.	69
Şekil 3.9. ERK Aktivasyonunun Zamana Bağlı Olarak Değişimi.	70
Şekil 3.10. $\beta$ arrestin Proteinlerinin Susturulması.	72
Şekil 3.11. Karvedilol ve Adrenalin Uygulamasından Sonra cAMP ve IP3 Miktarları.	73
Şekil 3.12. Hücrelerde Yağ Asidi Metabolizmasında Görevli Proteinler.	75
Şekil 3.13. Hücrelerde Glukoz Taşıyıcı Proteinler.	76
Şekil 3.14. Hücrelerde Mitokondriyal Biyojenezde Görevli Proteinler.	77
Şekil 4.1. Karvedilolün $\beta$ arr Aracılı Etkileri.	84

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 2.1.</b> Cihazlar	40
<b>Çizelge 2.2.</b> Kimyasal Maddeler	41
<b>Çizelge 2.3.</b> Antikorlar	43
<b>Çizelge 2.4.</b> Deney Grupları	45
<b>Çizelge 2.5.</b> Ayırıcı Jel Formülasyonu	53
<b>Çizelge 2.6.</b> Yükleme Jel Formülasyonu	54
<b>Çizelge 3.1.</b> Sıçanların Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Parametreleri.	58

## 1. GİRİŞ

Beta adrenerjik reseptör (AR) blokörleri ya da kısaca  $\beta$ -blokörler, miyokard infarktüsü sonrasında gelişen morbidite ve mortaliteyi azaltmakta ve kalp yetmezliği hastalarında sağ kalım oranını artırmaktadırlar. Bunların yanı sıra hipertansiyon tedavisinde, anjina profilaksisinde ve aritmide de kullanılmaktadırlar. Karvedilol, vazodilatör etkileri de bulunan üçüncü kuşak  $\beta$ -blokörler ailesinin üyelerinden biridir ve  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -AR'lerin yanı sıra alfa ( $\alpha$ )-1 AR'yi bloke etmektedir. Karvedilol, klinik olarak stabil hastalarda miyokard infarktüsünü izleyen sol ventrikül fonksiyon bozukluğu, orta ve ağır kalp yetmezliği ve hipertansiyon tedavisinde kullanılmak üzere Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından onaylanmıştır. Akut miyokard infarktüsü, esansiyel hipertansiyon, kalp yetmezliği, kardiyomiyopati tedavisinde, kardiyovasküler mortalite riskinin azaltılmasında ve ayrıca miyokard infarktüsü ve stabil anjina profilaksisinde kullanılmak üzere ise TİTCK tarafından onaylanmıştır.

Yapılan farklı klinik çalışmalarda aynı endikasyonlar için kullanılan diğer  $\beta$ -blokör ilaçlarla (metoprolol, bisoprolol ve atenolol gibi) karşılaştırılmış olan karvedilolün miyokard infarktüsü önlemek hatta mortaliteyi azaltmak bakımından üstün olduğu görüşü ortaya çıkmıştır (Kopecky, 2006 ve Poole-Wilson ve ark., 2003). Hipertansiyon ya da kalp yetmezliği için kronik olarak kullanılan bazı  $\beta$ -blokörün insülin rezistansı ya da diyabet oluşmasına neden olabilecekleri gösterilmişken, karvedilol bu anlamda hem nonselektif  $\beta$ -blokörlerden hem de selektif  $\beta_1$ -blokörlerden farklılaşmaktadır. Örneğin,  $\beta_1$ -blokörler olan atenolol ve metoprololün insülin duyarlılığında, sırasıyla, %13 ve %20 azalmaya neden oldukları gösterilmiştir (Pollare ve ark., 1989). Antihipertansif olarak kullanılan pindolol ve propranololün ise insülin duyarlılığında sırasıyla %17 ve %34 azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Lithell ve ark., 1992). Nonselektif  $\beta$ -blokörlerin ise diyabet oluşma

riskini artırdığı bulunmuştur (Samuelsson ve ark., 1994). Karvedilolün ise insülin duyarlılığını artırdığı, serum lipid profilini düzelttiği (Jacob ve ark., 1996) ve ayrıca diyabet oluşma riskini azalttığı (Torp-Pedersen ve ark., 2007) bildirilmiştir. Bu veriler karvedilolün metabolik profil üzerinde etkileri olabileceğini göstermektedir.

Karvedilolün AR'leri antagonize ederken hücre içinde  $\beta$  arrestin ( $\beta$ arr) proteinleri aracılığıyla "agonist" gibi davrandığı ilk kez 2007 yılında gösterilmiştir ve karvedilol bundan sonra *biased* agonist olarak adlandırılmıştır. Son yıllarda,  $\beta$ arr proteinlerinin işlevlerinin yalnızca reseptör desensitizasyonu ile sınırlı olmadığı ve karvedilol gibi üçüncü kuşak  $\beta$ -blokörlerin hücre içinde gerçekleşen sinyalizasyon süreçlerine de aracılık ettikleri gösterilmiştir. Bu veriler, karvedilolün etki mekanizmasının yalnızca AR'leri bloke etmesinden başka bileşenler de içerebileceğini göstermektedir.

Beta arrestin proteinleri, bazı reseptörlerle ( $\beta_2$ -AR gibi) oluşturdukları etkileşimler nedeniyle hücre içinde yaygın etkili sinyalizasyonları (Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Protein-ERK gibi) başlatan proteinlerdir. Beta arrestin proteinlerinin hücre içinde düzenledikleri fizyolojik olaylar yeterince aydınlatılamamıştır. Ancak  $\beta$ arr1 ve/ya  $\beta$ arr2 eksikliği ile insülin rezistansı ve obezite arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Karvedilol de kardiyovasküler ve metabolik olarak "tercih edilir" özelliklerini  $\beta$ arr proteinlerini aktive edici etkisi nedeniyle kazanıyor olabilir.



## 1.1. G-Proteini ile Kenetli Reseptörler ve Desensitizasyon

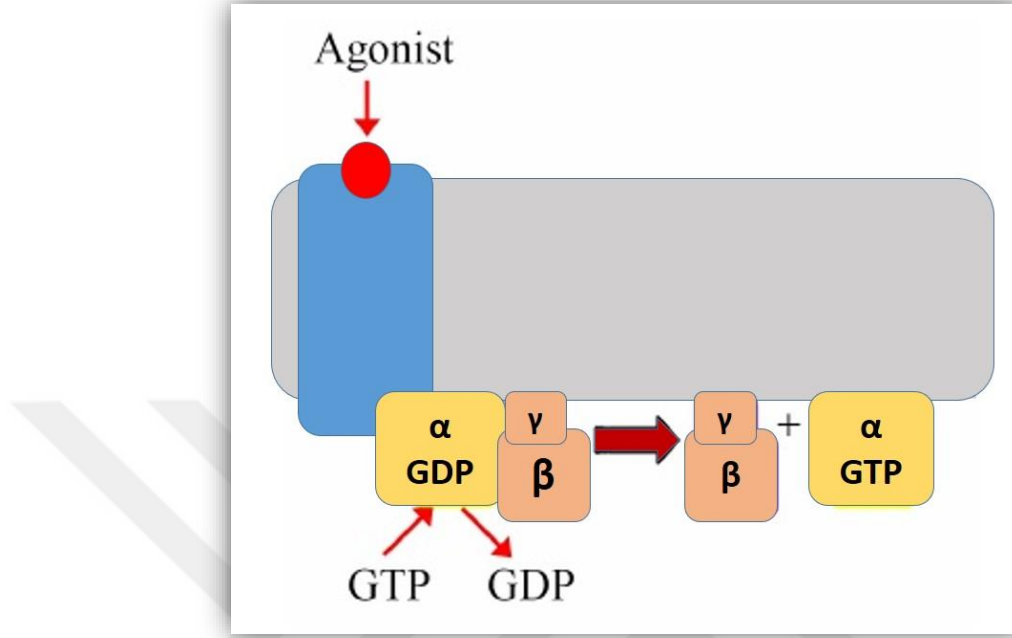
G-proteini ile kenetli reseptörler (GPCR), bilinen en büyük membran reseptör ailesidir. FDA onaylı ilaçların %30'u etkilerini bu reseptörler üzerinden direkt veya indirekt etkileşimle göstermektedir (Muller, 2000 ve Overington ve ark., 2006). GPCR aktivasyonu ile birçok biyokimyasal reaksiyon etkilenmekte; hücre yapısı, motilitesi ve gen ekspresyonları düzenlenmektedir.

GPCR'ler 7-Transmembranal Reseptör (7-TMR) olarak da bilinirler. Bu şekilde adlandırılmalarının sebebi reseptörün yedi kez hücre membranından geçen; intrasellüler ve ekstrasellüler döngüler oluşturan bir yapısı olmasıdır. Agonist reseptöre bağlandığında intrasellüler bölümde konformasyonel değişiklikler gözlenmekte ve sinyal iletimi başlamaktadır.

### 1.1.1. G-Proteini ile Kenetli Reseptör Fizyolojisi

G-proteinleri membran içine yerleşmiş  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimlerinden oluşan, üçlü yapıya sahip ve guanin nükleotid bağlayıcı olarak bilinen proteinlerdir. Reseptör uyarılmamış durumdayken G-proteininin guanozin difosfata (GDP) afinitesi yüksektir. Reseptöre çeşitli ekzojen kimyasallar, nöromediyatörler, hormonlar ve sitokinler gibi efektör moleküllerin bağlanması, G-proteinini harekete geçirmektedir. Reseptör aktive edildiğinde, G-proteininin  $\alpha$  alt birimi  $\beta\gamma$  kompleksinden ayrılmakta, bu ayrılma ile  $\alpha$  alt biriminin GDP afinitesi azalmaktadır. GDP, guanozin trifosfat

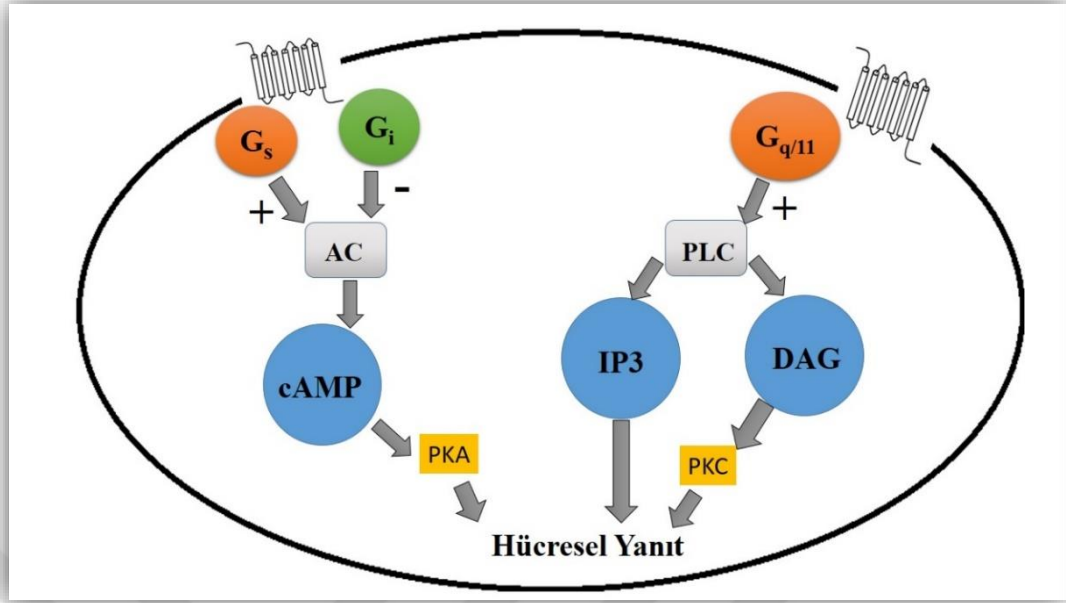
(GTP) ile yer değiştirmektedir. GTP'ye bağlanan alt birim hareket kazanarak hedef molekülü aktive etmektedir (şekil 1.1).



**şekil 1.1.** G-proteininin Aktivasyonu

GDP: Guanozin Difosfat, GPCR: G-proteini ile Kenetli Reseptör, GTP: Guanozin Trifosfat

Heterotrimerik G-proteinleri dört  $\alpha$  grubuna ayrılır:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{12/13}$  (McCudden ve ark. ve 2005, Zhuang ve ark., 2011b). Adrenerjik reseptörlere bu alt gruplardan  $G_s$ ,  $G_i$  ve  $G_{q/11}$  kenetlidir.  $G_s$  ve  $G_i$ , hedef molekülleri adenilil siklazı (AC) sırasıyla stimüle ve inhibe etmektedir. AC stimüle edildiğinde ikincil ulak olan siklik adenozin monofosfatı (cAMP) aktive etmektedir. cAMP, Protein Kinaz A'yı (PKA) uyararak L tipi kalsiyum kanallarının (Gerhardstein ve ark., 1999 ve Zhao ve ark., 1994), fosfolambanın (Simmerman ve Jones, 1998), troponin I'nın (Sulakhe ve Vo, 1995), ryanodin reseptörlerinin (Marx ve ark., 2000), miyozin bağlayıcı proteinin (Kunst ve ark., 2000), protein fosfataz inhibitör 1'in (Zhang ve ark., 2002) fosforilasyonlarını başlatmaktadır.  $G_{q/11}$  ise fosfolipaz C (PLC) enzimini aktive ederek hücre membranında bulunan fosfatidilinozitol 4,5 bifosfat hidrolizine ve böylece diaçil gliserol (DAG) ve inozitol 1,4,5 trifosfat (İP3) ikincil ulaklarının oluşumuna neden olmaktadır. Bu ikincil ulaklar ise intrasellüler kalsiyum düzeyinin ve protein fosforilasyonlarının artmasının yanı sıra fosfolipaz A2 stimülasyonu ile eikozanoidlerin salıverilmesini de artırmaktadırlar (şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Adrenerjik G-proteini Kenetli Reseptörlerde Sinyal İletimi

AC: Adenilil Siklaz, cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat, DAG: Diaçil Gliserol,  $G_i$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_s$ : G-proteini alt tipleri, IP3:İnozitol-3-Fosfat, PKA: Protein Kinaz A, PKC: Protein Kinaz C, PLC: Fosfolipaz C

## 1.1.2. $\beta$ Arrestin Proteinleri ve Desensitizasyon

### 1.1.2.1. Desensitizasyon

GPCR'ler üzerinden ilerleyen sinyaller, reseptörün desensitizasyona uğraması ile azalmaktadır. GRK enzimi desensitizasyonda hız sınırlayıcıdır. Fosforilasyon sonucu hareketlenen  $\beta$ arr proteinleri sitozolden membrana doğru ilerleyerek reseptöre bağlanmakta ve reseptörün internalizasyonuna neden olmaktadır. Memelilerin tüm dokularında  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 bulunmaktadır (Lymeropoulos ve ark., 2012 ve Lymeropoulos ve Bathgate, 2013). Direkt olarak GRK ile fosforillenmiş GPCR'lere bağlanmakta ve bu şekilde stekiyometrik bir kompleks oluşturmaktadırlar. GRK'lerin reseptörü fosforilleme bölgesi  $\beta$ arr etkileşimi için

önemlidir. Reseptörler agonist uyarısı sonucunda saniyeler içinde homolog desensitizasyona uğramaktadır. GPCR desensitizasyonu, G-protein kenetli reseptör kinazların (GRK) ve  $\beta$ arr proteinlerinin koordineli çalışması sonucu gözlenmektedir (Benovic ve ark., 1987). Reseptöre özgü GRK, reseptörü fosforile etmektedir. GRK tarafından fosforilasyon, desensitizasyonun ilk basamağıdır. Fosforilasyon bölgesi olmayan mutant reseptörlerde veya GRK enzimi olmayan hücrelerde yapılan çalışmalarda  $\beta$ arr proteinlerine afinitenin (*recruitment*), reseptörün hücre içine çekilmesinin (*internalization*) ve bu şekilde desensitizasyonun kaybolduğu gözlenmiştir (Bouvier ve ark., 1988 ve Kong ve ark., 1994).

Beta arrestinler GPCR sinyalinin düzenlemesini yalnızca GPCR'ın hücre içine çekilmesi ile sağlamazlar, aynı zamanda fosfodiesterazların (PDE) ve diaçilgliserol kinazların (DAGK) üst yolaklarında da bulunmaktadırlar (Reiter ve ark., 2012 ve Shenoy ve Lefkowitz, 2011). PDE, cAMP sinyalini cAMP'yi AMP'ye çevirerek yok etmektedir. Bu yol ile  $\beta$ arr2 cAMP seviyelerini ve cAMP ile aktive olan PKA seviyelerini azaltmaktadır (Perry ve ark., 2002). Benzer şekilde  $G_{q/11}$  proteini ile kenetli reseptörlerde DAGK'ların uyarılmasına aracılık eden  $\beta$ arr proteinleri DAG ile aktive olan PKC seviyelerini azaltmaktadır (Nelson ve ark., 2007).

#### **1.1.2.2. ERK Aktivasyonu**

İlk olarak göz dokusunda buldukları gösterilen arrestin proteinlerinin büyük bir aile oldukları sonradan ortaya konmuştur (Lefkowitz, 2013 ve Shukla ve ark., 2011). Buna göre arrestin 1 ve arrestin 4 gözde, arrestin 2 ( $\beta$ arr1) ve arrestin 3 ( $\beta$ arr2) tüm vücutta bulunmaktadır. Görevlerinin yalnızca desensitizasyon ile sınırlı olmadığı saptanan  $\beta$ arr proteinleri, günümüzde kabul gören görüşe göre farklı sinyal

yolaklarını başlatma becerisine sahiptir. Bu sinyaller G-proteininden bağımsızdır ve GPCR- $\beta$ arr kompleksinin endozomal kompartmana ilerlemesiyle gerçekleşmektedir. Buna göre  $\beta$ arr1,  $\beta_2$ -AR'de bir nonreseptör tirozin kinaz olan Src (Proto-onkojenik Tirozin Kinaz) aracılı olarak ERK aktivasyonuna neden olmaktadır (DeFea ve ark., 2000 ve Luttrell ve ark., 1999). Reseptörün ya da  $\beta$ arr1'in mutasyonu ERK aktivasyonunu inhibe etmektedir (Luttrell ve ark., 1999 ve Miller ve ark., 2000). ERK aktivasyonu,  $\beta$ arr proteinlerinin yeni tanımlanan sinyalizasyon görevinin en önemli aşamalarından biridir. ERK, mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK) olarak adlandırılan ve hücre siklusunun düzenlenmesi, transkripsiyonel düzenlemeler ve apoptozis gibi önemli hücresel fonksiyonların kontrolünde görevli olan serin/treonin kinaz ailesinin üyelerinden biridir. Src fosforilasyonunun GPCR ile aktive olan çeşitli mitojenik sinyaller için gerekli olması  $\beta$ arr proteinlerinin intrasellüler sinyal iletiminde yer aldıklarına işaret etmektedir. DeFea ve ark. (2000) çalışmalarında apoptozisin engellenmesi ve mitojenik sinyalizasyonunun başlaması için Src ve  $\beta$ arr etkileşmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir.

Beta arrestin proteinlerinin 1 ve 2 izoformları %78 amino asit benzerliği göstermektedir ve  $\beta$ arr1 veya  $\beta$ arr2 genleri silinmiş (*knockout*) fare modelleri yaşamlarını sürdürebilirken; her iki izoformun da olmaması embriyotoksiktir (Bohn ve ark., 1999; Conner ve ark., 1997 ve Kohout ve ark., 2001). Bu durum izoformların fonksiyonel olarak birbirlerini desteklediklerine işaret etse de, hücre ve reseptör çeşidine göre  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 farklı sinyal yollarında rol alabilir; hatta birbirlerine tamamen zıt olarak çalışabilirler. Biri bir sinyali çalıştırırken, diğeri durdurabilir (Karşılıklı düzenleme). RNA susturma (*RNA silencing*, siRNA) teknolojisi izoforma özgü bazı farklı yanıtların belirlenebilmesine olanak verirken bazı ilginç bulguları da beraberinde getirmektedir. Örneğin HEK293 hücrelerde  $\beta$ arr2'nin susturulması anjiyotensin reseptör aktivasyonunu izleyen ERK fosforilasyonunu ve aktivasyonunu azaltırken;  $\beta$ arr1'in susturulması ERK aktivasyonunu etkilememiştir (Ahn ve ark., 2004b). Öte yandan,  $\beta_2$ -AR aracılı ERK aktivasyonu hem  $\beta$ arr1 hem de  $\beta$ arr2'nin susturulması ile azalmaktadır (Shenoy ve ark., 2006). Yine siRNA teknolojisi kullanılarak HEK293 hücrelerinde anjiyotensin reseptörlerinde G-proteinleri ve  $\beta$ arr

proteinlerinin birbirinden bağımsız ve aditif olarak ERK aktivasyonuna yol açtıkları bildirilmiştir (Ahn ve ark., 2004a).  $\beta_2$ -AR'de ve paratiroid hormon reseptöründe her iki izoformun da susturulmasının ERK sinyalini azalttığı tespit edilmiştir (Gesty-Palmer ve ark., 2006 ve Shenoy ve ark., 2006).

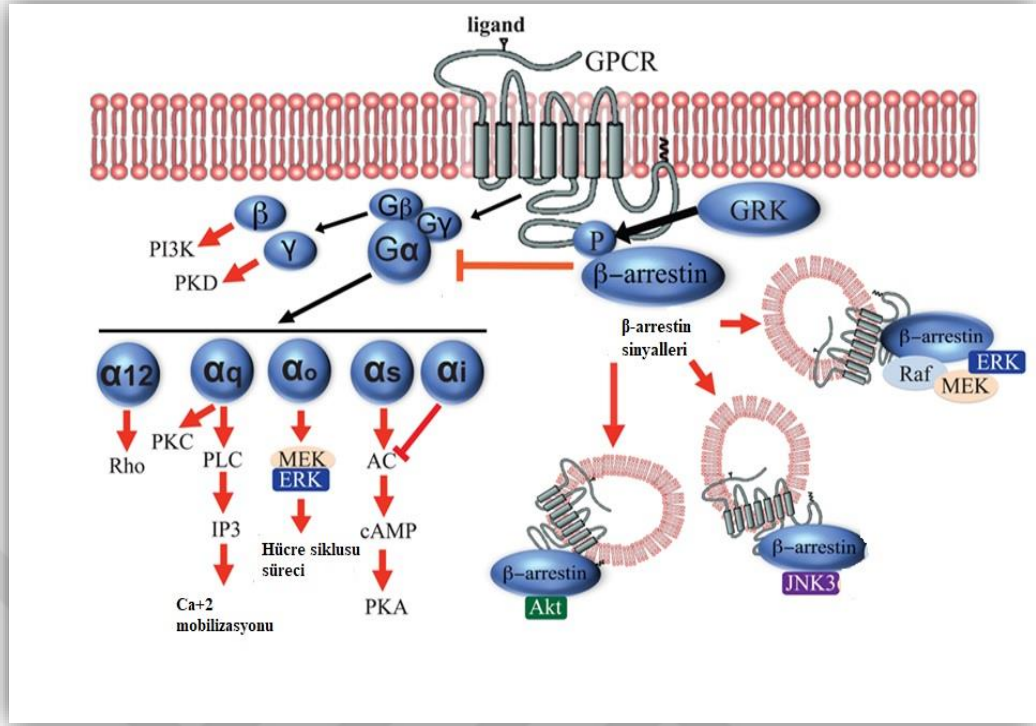
Ne var ki CRISPR/Cas9 tekniği ile HEK293 hücrelerinde  $\beta$ arr proteinleri ve çeşitli G-proteinleri silinen yeni bir çalışmada, ERK aktivasyonuna farklı bir yorum getirilmiştir. Grundmann ve ark. (2018) GPCR'lerde G-proteini olmasa da  $\beta$ arr sinyalini başlatabilmişlerdir. Prostaglandin D2 ile uyarılmış D prostanoid reseptör 2, agonisti MDL29951 ile aktive edilmiş yetim GPR17 reseptörü ve propiyonat ile aktive edilmiş serbest yağ asidi reseptörü-2'de, G-proteinleri Pertussis toksini ile inhibe edildiğinde ERK fosforilasyonu erken ve geç fazda durmuşken;  $\beta$ arr proteinlerinin silinmesi ERK fosforilasyonunu etkilememiştir. Benzer çalışma  $\beta_2$ -AR açısından değerlendirilmek istenildiğinde karvedilol kullanılmış; ERK fosforilasyonunun  $\beta$ arr proteinleri olmasa da tetiklendiğini; ancak  $G_s$  proteini yokluğunda fosforilasyonun durduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar yapılan diğer çalışmalarla ortaya konulan bu farklılığın;  $\beta$ arr proteinlerine ait genlerin bu çalışmada tamamen silinmesinden kaynaklandığını ileri sürmüşler; siRNA ve shRNA tekniklerinin bu noktada eksik kalabileceğini ve bu nedenle değerlendirmelerin yanlış olabileceğini vurgulamışlardır.

Beta arrestin proteinlerinin rol aldığı sinyaller GPCR tipine ve aynı zamanda hücrenin fizyolojisine ve patofizyolojisine göre değişmektedir. Bu sinyallerden en iyi karakterize edilmiş olan ERK aktivasyonu, hem G-proteini hem  $\beta$ arr aracılığı ile olabilmektedir. Bu aktivasyona çoğu GPCR'de  $\beta$ arr ve G-proteinlerinin her ikisi de neden olmakta; ancak bu aktivasyonu G-proteini hızlı,  $\beta$ arr yavaş gerçekleştirmektedir. Bazı durumlarda G-proteini de yavaş faz içerebilir; bu nedenle hız, hangi yolak ile ERK'in aktive olduğunu anlayabilmek için tek başına yeterli değildir (Luo ve ark., 2008). Beta arrestin aracılı ERK aktivasyonunun sinyal

kaskadında Raf-1 (Proto-onkojenik serin-treonin protein kinaz), mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz (MEK) ve ERK bulunmakta; fosforile ERK sitozolde tutulmaktadır (Luttrell ve ark., 2001). G-protein aracılı ERK aktivasyonu geçicidir; nükleusta etkisini gösterir ve gen transkripsiyonunu etkiler. Oysa  $\beta$ arr aracılı ERK sinyali hücre zarına yakın klatrin kaplı yapılarda gerçekleşir (DeWire ve ark., 2007; Eichel ve ark., 2016 ve Lefkowitz ve Shenoy, 2005).

### **1.1.2.3. $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Diğer Sinyalleri**

ERK'in aktivasyonunda büyük rol oynayan  $\beta$ arr proteinleri, aynı zamanda MAPK ailesinden p38 ve c-Jun-N terminal kinaz (JNK) aktivasyonlarında da görevlidir.  $\beta_2$ -AR'de bifazik p38 aktivasyonunun erken fazı  $\beta$ arr1 aracılığı ile gerçekleşirken, geç faz  $G_s$ -cAMP aracılı gerçekleşmektedir (Gong ve ark., 2008).  $\beta$ arr proteinleri, çevresel ve hormonal strese karşı gelişen apoptotik yanıtta ve immün hücre aktivasyonu için gerekli olan JNK sinyalinde de etkin bir role sahiptir; JNK3 fosforilasyonu ve aktivasyonu için  $\beta$ arr2 gerekmektedir. Anjiyotensin-1 reseptöründe agonist stimülasyonu ile endozomlarda JNK3 aktivasyonu  $\beta$ arr2 aracılı olarak gerçekleşmektedir (McDonald ve ark., 2000) (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3.**  $\beta$  arrestin-aracılı Sinyalizasyonlar

AC: Adenilil Siklaz, Akt: Protein Kinaz B, cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat, ERK: Ekstrasellüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz, GRK: G-protein Reseptör Kinaz, IP3: İnozitol-3-Fosfat, JNK3: c-Jun N-terminal Kinaz, MEK: Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz, PI3K: Fosfatidilinozitol-3-Kinaz, PKA: Protein Kinaz A, PKC: Protein Kinaz C, PLC: Fosfolipaz C (Bologna ve ark., 2017)

Posttranslasyonel modifikasyonlar  $\beta$ arr proteinlerini reseptör ve liganda göre farklı sinyalizasyonlara yönlendirmektedir (Jean-Charles ve ark., 2016a; Jean-Charles ve ark., 2016b; Kommaddi ve Shenoy, 2013; Lee ve ark., 2016 ve Oakley ve ark., 1999).  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 farklı bölgelerden fosforillenmektedir (Lin ve ark., 1997). Reseptör aktivasyonunu takiben arrestinlerin defosforile olması bazı fonksiyonlar için, örneğin  $\beta$ arr-aracılı MAPK sinyali için, gerekmektedir.  $\beta$ arr proteinlerinin ubiquitin ile kovalent modifikasyonu ise  $\beta$ arr-GPCR kompleksinin oluşmasına ve MAPK aktivitesinin uzamasına neden olmaktadır (Shenoy ve Lefkowitz, 2003).

Beta arrestinlerin yalnızca GPCR'lere değil, yapısal olarak farklı reseptörlerin de sinyalizasyon yollarına katılıyor olduğunun gösterilmesi, bu proteinlerin



biyolojik rollerinin çok yaygın olabileceğine işaret etmektedir. Örnek olarak, tirozin kinaz reseptör ailesinin bir üyesi olan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) reseptörünün aktive olması, hücre içinde fosfatidilinozitol-3-kinazı (PI3K) aktif hale getirmekte ve bu durum, reseptörün iyi karakterize edilmiş hücre büyümesi gibi etkilerinin başlangıcını oluşturmaktadır. Beta arrestin 1 ve 2 genleri silinmiş fare embriyonik fibroblast hücrelerinde IGF-1'in PI3K üzerindeki aktive edici etkisi ortadan kalkmakta,  $\beta$ arr1 ekspresyonu ile yeniden kazanılmaktadır (Povsic ve ark., 2003). Aynı çalışmada, PI3K'nın hücre içindeki önemli hedeflerinden biri olan Akt'nin (PKB/ protein kinaz B)  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 genleri silinmiş hücrelerde değil  $\beta$ arr1 taşıyan hücrelerde fosforile olduğu da gösterilmiştir (Povsic ve ark., 2003).

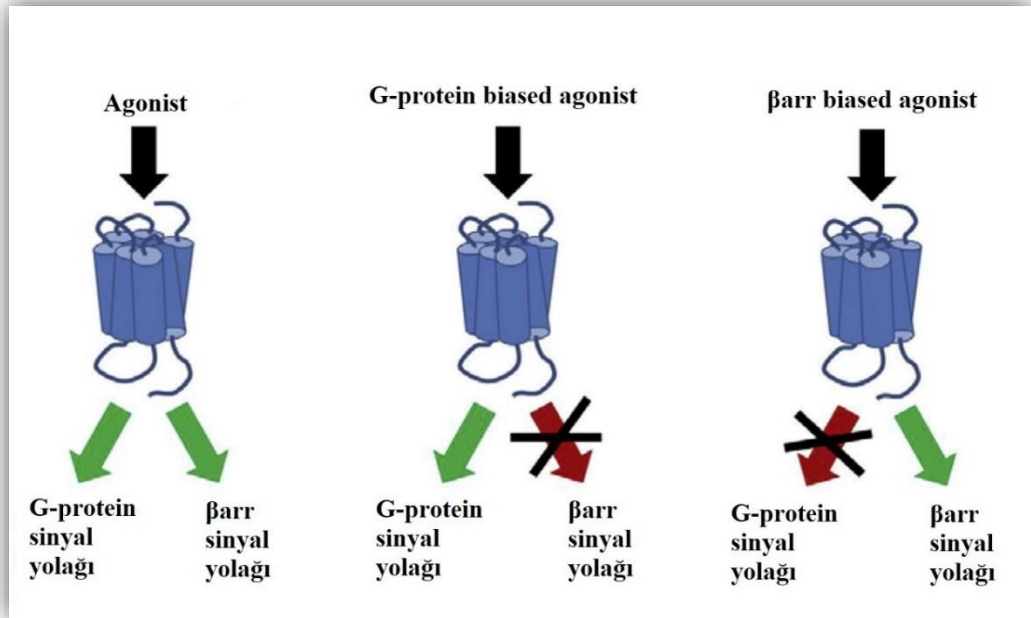
$\beta$ arr proteinlerinin fonksiyonları hakkında hala cevaplanmamış sorular bulunmaktadır. Bu proteinler farmakolojide hücrel sinyal iletim mekanizmalarına yeni bir yaklaşım getirilmesine aracılık etmektedir ve bu kapsamda yeni *biased* moleküllerin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

### **1.3. G-Protein Kenetli Reseptörlerde *Biased* Agonizma**

#### **1.3.1. *Biased* Agonizma Tanımı**

*Biased* sinyal kısaca, bir ligandın reseptöre bağlandıktan sonra farklı alt sinyal basamaklarından bir tanesini tercih etmesi durumudur. *Biased* agonizma, fonksiyonel seçiciliğin bir çeşidi olarak ortaya çıkan yeni bir terimdir (Andresen, 2011).

GPCR sinyali, iyi bilinen  $G_\alpha$  ve  $G_{\beta\gamma}$  ve daha yeni kabul gören GRK/ $\beta$ arr olmak üzere en az iki farklı hücre içi yolağtan ilerlemektedir. Agonistler bu iki yolağı aynı anda aktive ederken, tam antagonistler her iki yolağtaki sinyali durdurmaktadır. *Biased* agonistler ise bu yolağlardan bir tanesini seçmektedir. Örneğın, klasik tanıma uyan “agonist” bir ligand; bir GPCR olan  $\beta$ -AR’ye bağlandığında hem  $G_\alpha$  ve  $G_{\beta\gamma}$  hem de  $\beta$ arr-aracılı sinyalizasyonu başlatırken, “*biased* agonist” özellikte ligand ya  $G_\alpha$  ve  $G_{\beta\gamma}$  ya da GRK/ $\beta$ arr-aracılı sinyalizasyonu başlatmaktadır. Böyle ligandların varlığı agonist ve antagonist kavramlarının yeniden değeriendirilmesine neden olmuştur. Violin ve ark. (2007) bu kavramların yanına mükemmel ve mükemmel olmayan *biased* agonist kavramını da eklemiştirlerdir. Bu yazarlara göre, *biased* ligand reseptörün alt yolağlarından bir tanesini spesifik olarak uyaran liganddır. Mükemmel olmayan *biased*, ligandın reseptörlere bağlandığında farklı sinyalleri farklı derecelerde uyarması iken (bir yolağı tam agonistken, diğeriye parsiyel agonist olması); mükemmel *biased*, ligandın reseptörü uyarması ile yalnızca bir yolağın aktive olması, başka hiç bir aktivitenin gerçekleşmemesi durumudur (Şekil 1.4).



**Şekil 1.4.** GPCR’lerde *Biased* Agonizma.  
Rankovic ve arkadaşlarının (2016) çiziminden uyarlanmıştır.

Bilinen kavramlara eklenen bu detaylara göre, GPCR'lere bağlanan bir ligandı sınıflandırırken gözlemlenen sonuçlar  $G_{\alpha}$  ve  $G_{\beta\gamma}$  aracılı olaylarla sınırlı kalırsa, ligand antagonist olarak adlandırılabilir. Nitekim klasik  $\beta_2$ -AR antagonisti olan propranololün bu reseptörlerde  $\beta$ arr *biased* agonist özellik gösterdiği bildirilmiştir (Azzi ve ark., 2003 ve Baker ve ark., 2003). Bu bilgilerin ışığında, antagonist maddelerin “beklenmeyen etkileri” ya da aynı reseptörü antagonize eden ilaçların klinikte birbirinden farklı etkiler oluşturması da kısmen açıklanabilmektedir.

### 1.3.2. Barkod Hipotezi

*Biased* sinyalin başlayabilmesi için, ligand reseptöre bağlandıktan sonra reseptörün GRK'ler tarafından fosforile edilmesi gerekmektedir. Bunun nedeni  $\beta$ arr proteinlerinin ancak GPCR'lerin GRK'ler tarafından fosforile olmasından sonra reseptöre afinite kazanabilmeleridir. Bu fosforilasyon özellikle karboksi ucunda ve intrasellüler kıvrımlarda gerçekleşmektedir (Bologna ve ark., 2017). Barkod hipotezine göre farklı GRK'ler, GPCR'leri karboksi ucunun farklı bölgelerinden fosforillemektedirler. Bu durum reseptörün hangi  $\beta$ arr proteinini aktive edeceğini belirleyen bir barkod gibidir (Butcher ve ark., 2011). Çeşitli reseptörlerde yapılan çalışmalar bu duruma açıklık getirmektedir. Örneğin bir  $\beta$ arr *biased* ligand olan karvedilol bağlanması,  $\beta$ -AR'yi tam agonist isoproterenolden farklı bir GRK'nin reseptörü fosforillemesine neden olmaktadır (Nobles ve ark., 2011). İnternalizasyon için GRK2 ve GRK3'e gereksinim var iken,  $\beta$ arr-aracılı sinyal iletimi için GRK5 veya GRK 6'ya ihtiyaç vardır (Jones ve ark., 2007; Kara ve ark., 2006 ve Zidar ve ark., 2009). Nobles ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada GRK2 ve GRK6 ile fosforile olan  $\beta_2$ -AR'nin internalize ve desensitize olduğuna, sadece GRK6 ile fosforile olan reseptörün  $\beta$ arr-aracılı ERK fosforilasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir.

*Biased* ligandlar reseptörün tek bir konformasyonuna özel olarak sinyal iletimini sağlayabilirler. Her ligandın uyarabildiği reseptör konformasyonu birbirinden farklıdır. Bu konformasyon G-proteini aktive olduğunda gözlenen konformasyon ile aynı değildir (Bologna ve ark., 2017). Örneğin Rahmeh ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, Arjinin-Vazopressin tip 2 reseptöründe; altıncı transmembranal segment ve üçüncü intrasellüler kıvrım hareketinin G-proteini sinyali için şart iken,  $\beta$ arr sinyali için gerekli olmadığı; yedinci transmembranal segment ve helix 8 hareketinin  $\beta$ arr sinyali ile için gerekli olduğu bulunmuştur.

### 1.3.3. *Biased* Sinyalin Koruyucu Etkileri

Noma ve ark. (2007)  $\beta_1$ -AR'de G-proteininden bağımsız olarak ilerleyen  $\beta$ arr sinyalizasyonunun kardiyoprotektif olabileceğini göstermişlerdir. Bu sinyalde  $\beta$ arr proteini, ERK fosforilasyonuna ve EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) transaktivasyonuna aracılık etmektedir (Noma ve ark., 2007 ve Patel ve ark., 2008). Bazı durumlarda G-protein aracılı sinyal istenmeyen etkilere neden olurken;  $\beta$ arr *biased* sinyal olumlu bir etkiye aracılık edebilir. Örneğin bir  $\beta$ arr *biased* agonist olan karvedilol,  $\beta_1$ -AR ve  $\beta_2$ -AR'de G-protein aracılı sinyalleri bloke etmektedir. Öte yandan EGFR transaktivasyonunu ve ERK fosforilasyonunu G-proteininden bağımsız olarak uyarmaktadır (Kim ve ark., 2008; Noma ve ark., 2007 ve Wisler ve ark., 2007). Kronik  $\beta$ -AR  $G_s$  sinyali kardiyotoksik iken (Bristow, 2000 ve Lohse ve ark., 2003); EGFR transaktivasyonu kardiyoprotektiftir. Çalışmalar kronik katekolamin stresi altında EGFR sinyalinin koruyucu olduğunu göstermektedir. Örneğin kronik olarak katekolamin verilen farelere bir EGFR inhibitörü olan erlotinib uygulandığında kardiyak fonksiyonlarının bozulduğu gösterilmiştir. Benzer fonksiyonel bozulma kalplerinde  $\beta_1$ -AR aşırı üretimi (*overexpression*) olan farelerde de görülmüş ve bu farelerde EGFR transaktivasyonu gerçekleşmemiştir (Noma ve

ark., 2007). EGFR transaktivasyonu karvedilolün kalp yetmezliği tedavisinde diğer  $\beta$ -blokörlere üstünlüğünün nedenlerinden biri olabilir.

TRV120027 molekülü,  $G_q$  kenetli Anjiyotensin Reseptörü 1'de G-protein aracılı etkileri antagonize ederken aynı zamanda  $\beta$ arr aracılı sinyalizasyonu uyaran bir *biased* agonisttir (Holloway ve ark., 2002; Hunton ve ark., 2005; Rajagopal ve ark., 2006 ve Rakesh ve ark., 2010). Bu molekül vazokonstriksiyonun azalmasına ve kalp performansının artmasına neden olmaktadır (Violin ve ark., 2010) ve akut kalp yetmezliği için klinik çalışma aşamasına ulaşmıştır (www.ClinicalTrials.gov, identifier: NCT01966601, 28.09.2019). TRV120027 hipertrofiye yol açmadan kardiyak kontraktileti artırılmaktadır (Tarigopula ve ark., 2015).

Bu bilgiler ışığında  $\beta$ arr *biased* bir ligandın olumlu etkilerinin, zararlı G-protein sinyalini tetiklemeden faydalı hücre altı yolları uyarmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

#### **1.4. Kardiyovasküler İlaçların Hedefi Olarak Adrenerjik Reseptörler**

GPCR'ler, kardiyovasküler olayları düzenlemede etkin rol oynamaktadırlar.  $\beta$ -AR'nin antagonize edilmesi yaklaşımı, seçici olmayan bir  $\beta$ -blokör olan propranololün kan basıncını düşürmek üzere tedavide kullanılmasıyla ortaya çıkmıştır.  $\beta$ -blokörlerin farmakolojik etkinlikleri, endojen katekolaminlerin  $\beta$  reseptörler aracılığı ile ortaya çıkardıkları etkileri engellemeleri,  $\beta$  reseptör sayısını artırmaları (*upregulation*), kalp atım hızını azaltmaları ve katekolaminlerin mitojenik

etkisini engelleyerek yeniden yapılanmayı (*remodeling*) azaltmalarıyla açıklanmaktadır (Katzung, 2015).  $\beta$ -blokörlerin bu etkileri ile anjında oluşan ağrıyı azalttıkları (Black ve Prichard, 1973), hipotansiyon oluşturdıkları ve aritmiyi engelledikleri (Prichard, 1964 ve Prichard ve Gillam, 1964) gösterilmiştir. Kalp atım hızı ve kardiyak debiyi azaltmalarının da antihipertansif ve antiaritmik etkilerine katkıda buldukları bildirilmiştir (Prichard, 1978).

Kalpdeki  $\beta_1$ -AR'yi selektif olarak antagonize ettikleri tespit edilen metoprolol ve bisoprolol gibi kardiyoselektif  $\beta$ -blokörler, nonselektif  $\beta$ -blokörlerin bronkokonstriksiyon ve periferik vasküler rezistans artışı gibi istenmeyen etkilerinin daha az görülmesine neden oldukları için ön plana çıkmışlardır. Günümüzde çoğu kaynak,  $\beta$  reseptörleri nonselektif olarak antagonize eden maddeleri 1. kuşak; doza bağlı olarak  $\beta_1$  reseptörlere daha yüksek afinite gösteren maddeleri 2. kuşak olarak sınıflandırmaktadır.  $\beta$ -blokörlerin 3. kuşağını ise vazodilatör etkinlikleri de bulunan karvedilol, nebivolol ve labetalol oluşturmaktadır (Fisker ve ark., 2015). *Biased* agonist kavramı ise GPCR'lerin yalnızca G-proteini ile kenetli olmadıklarını, aynı zamanda  $\beta$ arr proteinlerinin de sinyal iletimine katkıda bulduklarını ortaya çıkardığı için, kuşak sınıflandırmasına yeni bir bakış açısı getirmiştir.

#### **1.4.1. Karvedilolün Kardiyovasküler İlaçlar İçindeki Yeri**

Karvedilol, kalp yetmezliği, hipertansiyon ve miyokard infarktüs sonrasında gelişen ventriküler fonksiyon bozukluklarının engellenmesi için kullanılan 3. kuşak  $\beta$ -blokör ailesinin üyelerinden biridir. Büyük ölçekli klinik çalışmalarda diğer  $\beta$ -blokörler ile karşılaştırılmış, miyokard infarktüs ve kardiyovasküler mortaliteyi engellemek ve azaltmak bakımından üstün olduğu görüşü benimsenmiştir (Kopecky,

2006 ve Poole-Wilson ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar  $\beta$  reseptörlere ek olarak  $\alpha_1$  reseptörleri de bloke eden karvedilolün (Bristow ve ark., 1992) antioksidan, antiinflammatuar (Calo ve ark., 2005 ve Yue ve ark., 1992), antiproliferatif ve antiaritmik (Naccarelli ve Lukas, 2005) özelliklerinin avantaj oluşturabileceğini göstermektedir.

Çeşitli klinik çalışmalar ile karvedilolün metabolik profili iyileştirdiği gösterilmiştir. Örneğin karvedilol ve metoprololün kıyaslandığı çok merkezli ve randomize olarak tasarlanmış klinik bir çalışmada 24 hafta tedavinin sonunda karvedilolün glukoz ve ürik asit seviyelerini metoprolole göre daha çok düşürdüğü, total kolesterol ve LDL seviyelerini azaltmak bakımından da metoprolole üstünlük gösterdiği bildirilmiş ve metoprolole göre metabolik profili daha çok iyileştirdiği yorumu yapılmıştır (Martsevich ve ark., 2010). Benzer şekilde 45 hipertansif tip 2 diyabet hastası ile yapılan randomize ve çift kör olarak tasarlanmış bir klinik çalışmada da karvedilol ile atenolol kıyaslanmış, karvedilol glukoz ve lipid seviyelerinde anlamlı iyileşmeler gerçekleştirmiştir. Ayrıca karvedilol insülin duyarlılığını artırırken atenolol azaltmıştır. Karvedilolün, iskelet kaslarında  $\alpha_1$ -AR'leri bloke ederek kanlanmayı artırdığı ve insülin duyarlılığını da hücre içine glukoz alınmasını tetikleyerek artırdığı yorumu yapılmıştır (Giugliano ve ark., 1997).

Çok sayıda hasta ile yapılan çok merkezli, çift-kör, randomize olarak tasarlanmış GEMINI çalışmasında karvedilol metoprolol ile kıyaslanmış, karvedilolün insülin duyarlılığını artırdığı, metoprololün ise insülin duyarlılığına etki etmediği tespit edilmiştir (McGill ve ark., 2007). Tüm bunlar kronik kullanılması gereken bir ilaç için tercih edilecek özelliklerdir ve karvedilolün diyabet riski taşıyan hastalarda ve insülin rezistansı olan hastalarda güvenle kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır.

Sempatik aktivasyonun dolaşımdaki serbest yağ asidi miktarını artırması ve bunun sonucu olarak da kalbin enerji elde etmek için glukozdan daha çok yağ asidi kullanmaya yönelmesinin engellenmesinin, kalp yetmezliğinde kullanılan  $\beta$ -blokörlerin bu endikasyondaki etkinliklerine katkıda bulunuyor olabileceği bilinmektedir (Paolisso ve ark., 1994). Bunu incelemeye yönelik olarak tasarlanan bir çalışmada karvedilolün glukoz ve yağ metabolizması üzerindeki doğrudan etkileri miyosit hücre kültürlerinde propranolol, bisoprolol ve prazosinle karşılaştırılmış, karvedilol ve prazosinin glikolizi stimüle ederken yağ asidi oksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Onay-Besikci ve ark., 2012). Prazosinin de karvedilole benzer yararlı olarak adlandırılacak etkilerinin bulunması önceki bulguları destekler niteliktedir. Örneğin, obez hipertansiyon hastalarda 12 hafta prazosin kullanımı insülin duyarlılığını artırmıştır (Pollare ve ark., 1988). Karvedilol ve prazosinin ortak etki mekanizmaları her ikisinin de adrenerjik reseptörlerin -G-protein kenedinden bağımsız olarak- hücre içinde etkiledikleri ortak bir sinyalizasyon yolağı olabilir ve bu ortak sinyalizasyon  $\beta$ arr proteinlerinin aktivasyonu ile başlıyor olabilir.

#### 1.4.2. Bir *Biased Agonist* Olarak Karvedilol

Karvedilole özgü avantajların, bu maddenin hücre içinde neden olduğu farklı sinyalizasyonlardan kaynaklanıyor olabileceği düşüncesiyle Wisler ve arkadaşları içlerinde bisoprolol, labetalol ve propranololün bulunduğu 16  $\beta$ -blokörle HEK293 hücre dizisinde gerçekleştirdikleri çalışmada,  $\beta_2$ -AR'lerde  $\beta$ arr-aracılı olarak ERK aktivasyonuna yalnızca karvedilolün neden olduğunu bildirmişlerdir (Wisler ve ark., 2007). Bu çalışma ile bir  $\beta$ arr *biased* agonist olduğu kabul edilen karvedilol, GRK/ $\beta$ arr yolağını aktive etmekte,  $G_s$ -cAMP yolağını ise bloke etmektedir. Propranolol de karvedilol gibi  $\beta_2$ -AR'de  $G_s$ -AS sinyalinde invers agonist özelliği gösterir, ancak sadece karvedilol ERK sinyalini  $\beta$ arr-aracılı olarak aktive edebilmektedir (Nobles ve ark., 2011 ve Wisler ve ark., 2007).



Yapılan yeni çalışmalar karvedilolün ERK sinyalini aktive edebilmesi için gereken başka bileşenler de bulunduğunu ortaya koymuştur. Wang ve ark. (2017a)  $\beta_1$ -AR ekspresyonu yapan HEK293 hücrelerinde yaptıkları çalışmada karvedilolün doza bağlı olarak ERK fosforilasyonunu artırdığını; ancak  $G_i$  inhibitörü pertussis toksini uygulandığı zaman fosforilasyonun önemli derecede azaldığını bulmuşlardır. Toksin,  $\beta_2$ -AR'ler aracılığı ile oluşan ERK fosforilasyonunu etkilememiştir. Benzer çalışmayı  $\beta_1$ -AR'nin etkisini görebilmek için  $\beta_2$ -AR genleri silinen fare kalplerine Langendorff perfüzyon sisteminde karvedilol vererek de yapmışlar ve pertussis toksini uygulanan kalplerde ERK fosforilasyonunun tamamen engellendiğini gözlemişlerdir.  $\beta_1$ -AR genleri silinen farelerde ise pertussis toksini ERK fosforilasyonunun önüne geçememiştir. Bu çalışma karvedilolün  $\beta_1$ -AR'lerdeki *biased* agonist etkisini gösterebilmesi için  $G_i$  proteinine gereksinim duyduğunu göstermiştir.

Betal-AR'lerde  $\beta_{arr1}$  ve  $\beta_{arr2}$  aracılığıyla EGFR'nin aktive olmasının, katekolaminle kronik olarak stimüle edilen kalplerde koruyucu olduğu bildirilmiştir (Noma ve ark., 2007). Yirmi farklı  $\beta$  blokörle yapılan bir çalışmada yalnızca karvedilol ve alprenololün  $\beta_{arr}$ -aracılı EGFR transaktivasyon yolunu aktive ettiği bulunmuştur (Kim ve ark., 2008). Karvedilol, kardiyoprotektif EGFR aktivasyonunu,  $\beta_1$ -AR'de GRK5 veya GRK6 enzimleri aracılığı ile  $\beta_{arr}$  proteinlerini uyararak başlatmaktadır (Kim ve ark., 2008 ve Wisler ve ark., 2007). Araştırmacılar,  $\beta$  reseptörü işgal edip G-protein aracılı sinyalizasyonu engellerken bir yandan da  $\beta_{arr}$ /EGFR aracılı sinyalizasyonu aktive edecek bu "süper" ilaçların kardiyovasküler ilaçlar içinde yeni bir grup oluşturacağı yorumunu yapmışlardır. Kardiyoprotektif EGFR transaktivasyonu karvedilolün terapötik yararlarına kısmen ışık tutmaktadır (Noma ve ark., 2007).

Karvedilolün G-proteinden bağımsız ve  $\beta_{arr}$ -aracılı olarak yararlı kabul edilen etkilerine, olgunlaşmasını stimüle ettiği miRNA'lar (mikro ribonükleik asit) da

katkıda bulunmaktadır. Karvedilolün  $\beta_1$ -AR'ye bağlanması,  $\beta$ arr proteinleri aracılığı ile miRNA oluşumuna neden olur (Kim ve ark., 2014). miRNA'lar posttranskripsiyonel gen ekspresyonunu düzenleyen kodlanmayan RNA'lardır. Ekspresyonlarının bozulması halinde miyokard infarktüs ve hipertrofi görülebilen miRNA'lar, literatürde kardiyovasküler hastalıklarda yeni terapötik hedefler olarak adlandırılan biyobelirteçlerdir (Duggal ve ark., 2016 ve Naga Prasad ve ark., 2009). Karvedilolün aracılık ettiği miRNA oluşumu GRK5, GRK6 ve  $\beta$ arr1 varlığında gerçekleşebilmektedir. GRK5 ve GRK6 susturulduğunda bu etki görülmemektedir (Kim ve ark., 2014).

Karvedilolün  $\beta_1$ -AR'ye bağlanmasından ve GRK5 ve GRK6'nın reseptörü belli bölgelerden fosforillemesinden sonra  $\beta$ arr1, reseptör-ligand kompleksinden ayrılır ve nükleus içinde drosha mikroprozessör kompleksine bağlanarak beş adet miRNA'yı uyarır (*miR-150*, *miR-199a-3p*, *miR21*, *4miR-125a-5p* ve *miR-125b-5p*) (Bologna ve ark., 2017). Bunlar posttranskripsiyonel modifikasyon ile miyosit büyümesi, kardiyak kontraktilite ve ritim kontrolünün yanı sıra birçok patogeneizde rol oynayan mRNA'ları hedef alarak onların proteine dönüşmesine engel olurlar. miR-150, kardiyoprotektif bir etkiye sahiptir ve eksikliğinde miyokard infarktüs, atrial fibrilasyon, dilate kardiyomiyopati, iskemik hasar ve kalp yetmezliği gözlenmektedir (Goren ve ark., 2014 ve Tang ve ark., 2015). miR-199a-3p ve miR-214'ün iskemi-reperfüzyon sırasında karvedilol verilen kardiyomiyositlerde aktive olduğu ve sağ kalım ile ilişkili fosforile-Akt sinyalini aktive ettiği belirlenmişti (Park ve ark., 2016).

Fare kalplerinde yapılan yeni bir çalışmada, QRT-PCR metoduyla karvedilolün üç farklı miRNA'yı daha indüklediğini tespit edilmiştir (miR-466g, miR-532-5p, and miR-674). Bunlardan miR-532-5p'nin kalbi miyokard infarktüstten koruduğu bilinmekte; diğer iki miRNA'nın ise kardiyoprotektif potansiyele sahip olduğu iddia edilmektedir.  $\beta$ arr1,  $\beta$ arr2, GRK5 veya GRK6 genlerinden herhangi biri silindiğinde

bu indüksiyonun gözlenmemesi, sürece her birinin dahil olduğunu göstermiştir. Benzer değerlendirme  $\beta_1$ -AR ve  $\beta_2$ -AR genleri silinmiş farelerde de yapılmış; miR-466g ve miR-532-5p'nin  $\beta_2$ -AR genleri silinmiş farelerde; miR-674'nin  $\beta_1$ -AR genleri silinmiş farelerde indüklenemediği saptanmıştır (Teoh ve ark., 2018).

Gerek miRNA'lar aracılığı ile gerekse EGFR transaktivasyonu ile ortaya çıkan bu kardiyoprotektif etkiler karvedilolün *biased* agonist etkisi aracılığı ile gerçekleşmektedir ve onu diğer  $\beta$ -blokörlerden ayıran da bu etkilerdir. Karvedilol gibi üçüncü kuşak bir  $\beta$ -blokör olan nebivololün de yalnızca  $\beta_2$ -AR sentezleyen fare embriyonik fibroblast MEF hücrelerde ve  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -AR'lerin her ikisini de sentezleyen fare kardiyak miyosit HL1 hücrelerinde yapılan çalışmada,  $\beta$ arr aracılı olarak ERK fosforilasyonunu tetiklerken EGFR transaktivasyonu yaptığı bulunmuştur (Erickson ve ark., 2013). Nebivololün klinik yararlı etkilerinin karvedilol ile benzer olduğu düşünüldüğünde, ortak noktalarının *biased* agonizma olması bu iki molekülü ayrıcalıklı kılan faktör olarak görülebilir. Tez çalışmamızda karvedilol ile ortaya çıktığını tespit ettiğimiz karvedilole özgü metabolik etkilerin, *biased* agonizma ile ilişkili olup olmadığı değerlendirilmiştir.

## **1.5. Kardiyak Fonksiyon Bozukluklarında $\beta$ Arrestinlerin Rolü**

### **1.5.1. Kalp Yetmezliği**

Kalp yetmezliği hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları ve koroner kalp hastalıkları gibi çeşitli kardiyovasküler problemlerin son basamağı olarak karşılaşılan klinik bir sendromdur. Kısaca kalbin vücuda ihtiyacı olan kanı pompalamakta yetersiz kalması olarak tanımlanabilir.

Kalp yetmezliği durumunda  $\beta$ arr2'nin,  $\beta$ arr1'den farklı olarak kardiyak apoptozu, inflamasyonu ve miyokard infarktüs sonrası yeniden yapılanmayı önlediği bilinmektedir. McCrink ve arkadaşları adenoviral gen transferi ile  $\beta$ arr2 ekspresyonu artırılmış hayvan modelleri oluşturmuş; bu hayvanlarda miyokard infarktüs sonrası yeniden yapılanmanın azaldığını ve SERCA (Sarkoplazmik Retikulum Kalsiyum ATPaz) aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Kardiyak fonksiyonlardaki bu artışa apoptozisteki azalma eşlik etmiştir (McCrink ve ark., 2017). Kardiyak fonksiyonlarda bozulma gözlenen bu modellerde yapılan bu iki çalışma  $\beta$ arr proteinlerinin SERCA üzerinde farklı etkileri olduğunu ortaya koymuş ve  $\beta$ arr proteinlerinin hedef protein olabileceklerini göstermişlerdir. Beta arrestin proteinlerinin kalpteki etkileri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda genel olarak  $\beta$ arr1'in  $\beta$ -AR'lerin desensitizasyonundan sorumlu olduğu,  $\beta$ arr2'nin ise kardiyoprotektif yararlı etkilere sahip olduğu yorumu yapılmıştır (Bathgate-Siryk ve ark., 2014 ve Hodavance ve ark., 2016).

Beta arrestin 1 genleri silinmiş farelerde miyokard infarktüs modeli oluşturularak 2014 yılında yapılan bir çalışmada,  $\beta$ arr1 genleri silinmiş farelerin miyokard infarktüs sonrası kardiyak kontraktilitelerinin kontrol farelere göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. B tipi natriüretik peptid, atrial natriüretik faktör ve TNF (Tümör Nekroz Faktör) gibi inflamasyon belirteçlerinin  $\beta$ arr1 genleri silinmiş farelerde daha düşük seyrettiği ve ortalama arteryel kan basınçlarının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Üstelik  $\beta$ arr1 genleri silinmiş farelerde  $\beta$ -AR dansitesinin daha yüksek olduğu bulunmuş ve miyokard infarktüs sonrasında  $\beta$ -AR sayısının azalmasının bu farelerde daha az gerçekleştiği yorumu yapılmıştır. Beta arrestin 1 genleri silinmiş farelerde bunların yanı sıra SERCA aktivitesinin ve EGFR transaktivasyonunun artmış olduğu gösterilmiştir. EGFR transaktivasyonu,  $\beta$ 1-AR'lerin GRK5 tarafından fosforillendikten sonra  $\beta$ arr2 aracılığı ile gerçekleştirdiği antiapoptotik sinyaldir; bu çalışmada  $\beta$ arr1'in bu sinyali inhibe ettiği görülmüştür. Araştırmacılar,  $\beta$ arr1'in kalpte  $\beta$ arr2 gibi yararlı etkilere değil, aksine zararlı etkilere aracılık edebileceğini göstermişlerdir (Bathgate-Siryk ve ark., 2014).

### 1.5.2. Diyabetik Kardiyomiyopati

Diyabet, insülin sekresyonu azalmasına veya vücudun insülini etkili kullanamamasına bağlı olarak gelişen kronik metabolik bir hastalıktır ve kardiyovasküler ölümler açısından da bağımsız bir risk faktörüdür (Cohn ve ark., 1991, Packer ve ark., 1999). Diyabetik kardiyomiyopati, bağ doku ve kollajen birikiminden ötürü sol ventrikül duvarında artan katılık (*stiffness*) ile karakterizedir (Anguera ve ark., 1998; Rodrigues ve ark., 1995 ve Saito ve ark., 2003). Gözlenen hiperglisemi ve hiperlipidemi dolayısı ile gelişen kardiyomiyopati, kalpte yeniden yapılanmaya neden olmaktadır. Diyabetik kardiyak fonksiyonel bozukluk durumunda öncelikle diyastolik fonksiyonda ve bunu takiben de sistolik fonksiyonda bozulma gözlenmektedir (Poornima ve ark., 2006 ve Severson, 2004). Artan membran permeabilitesi ve  $Ca^{+2}$  işleyişinin bozulması, miyokard metabolizmasındaki bozukluklar ve kardiyomiyositlerin yapısal bozuklukları kardiyak fonksiyon bozukluğunun üç nedeni olarak öne sürülmektedir (Dhalla ve ark., 2014).

Hiperinsülinemi durumunda gözlenen kardiyomiyopatinin sinyalizasyon düzeyindeki nedenlerinden biri de insülinin kalpte GRK2 aracılı olarak  $\beta_2$ -AR'yi fosforillemesi; reseptörün  $\beta_{arr2}$  ile oluşturduğu kompleks sonucunda ERK fosforilasyonunu gerçekleştirmesidir. Beta arrestin 2 veya  $\beta_2$ -AR genlerinin silinmesinin veya bir *biased* agonist olan karvedilolün ya da bir GRK2 inhibitörü olan paroksetinin insülin bağlı bu fosforilasyonu engellediği gözlenmiştir (Wang ve ark., 2017b) .

## 1.6. Kalpte Substrat Metabolizması

Normal şartlarda kalbin enerji ihtiyacının çoğunluğu [Açığa çıkan ATP'nin (Adenozin trifosfat) %95'i] mitokondrilerde meydana gelen oksidatif fosforilasyonlar ile sağlanmaktadır. Oksidatif fosforilasyonda yakılan karbon kaynaklarından açığa çıkan nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve flavin adenin dinükleotid (FADH<sub>2</sub>) moleküllerinin dehidrojenizasyonu sonucunda ATP üretilmektedir. Bu moleküller yağ asitlerinin beta oksidasyonu, sitrik asit siklusu ve daha az olmak üzere pirüvat dehidrojenaz reaksiyonu ve glikoliz sırasında açığa çıkmaktadır (Stanley ve ark., 2005).

Kalp kasının en önemli özelliği yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyan, hiç kesilmeyen kontraksiyonlardır. Normal fizyolojik koşullarda kalp enerji ihtiyacı için substrat olarak yağ asitlerini, karbohidratları, amino asitleri, keton cisimleri ve laktatı kullanmaktadır ve ATP'nin %70'i yağ asitlerinden sağlanmaktadır (Avogaro ve ark., 1990). Kalp farklı fizyolojik ve farmakolojik koşullara göre çok hızlı bir şekilde substrat biçimini değiştirebilmektedir. Bu değişim ekstrasellüler hormonlara, substrat miktarlarına ve iş yüküne göre olmaktadır. Substrat değişimi ATP üretiminin sürekliliği için şarttır (Atkinson ve ark., 2002; King ve ark., 2005; Rodrigues ve ark., 1995; Schonekess, 1997 ve Stanley ve ark., 1997).

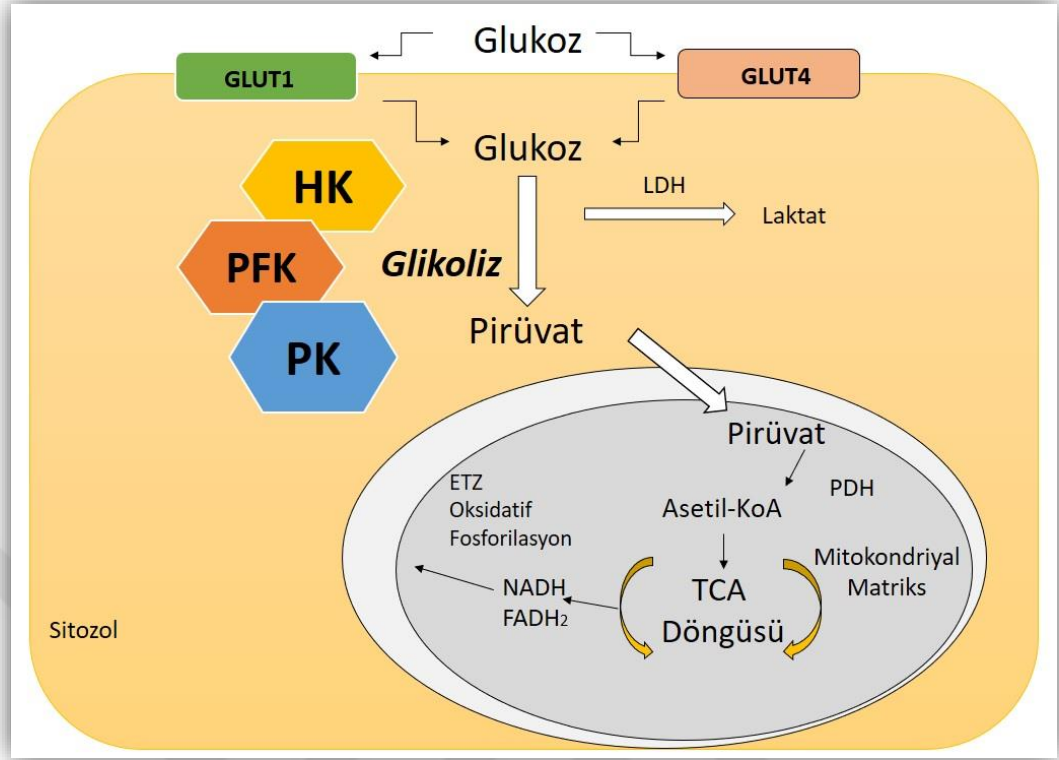
### 1.6.1. Karbohidrat Metabolizması

Glukoz, kardiyomiyositlerde sarkolemmadaki glukoz taşıyıcı proteinler (GLUT1 ve GLUT4) aracılığı ile hücre içine taşınır. Glukoz taşıyıcılarının sitoplazmadan sarkolemmaya translokasyonu insülin stimülasyonu ile gerçekleşir (Stanley ve ark., 2005).

Glikoliz enzimleri çoğunlukla sarkoplazmik retikulum ve sarkolemma yakınlarna yerleşmiş durumdadır. Bu durum glikolitik reaksiyonların belirli bölgelerde gerçekleştiğini gösterir. Glikoliz sırasında glukoz, üçü düzenleyici ve geri-dönüşümsüz olmak üzere [heksokinaz (HK), fosfofruktokinaz (PFK), pirüvat kinaz (PK)] 10 enzimle katalize olarak pirüvata dönüşmektedir (Li ve ark., 2015 ve Zwerschke ve ark., 2003) (Şekil 1.5).

Pirüvat laktat dehidrojenaz enzimi (LDH) ile laktata dönüştürülerek, asetil KoA'ya dekarboksile olarak, okzaloasetat ya da malata karboksile olarak üç şekilde kullanılabilir. Pirüvat dekarboksilasyonu karbohidrat oksidasyonunun geri-dönüşsüz basamağıdır ve mitokondrilerde pirüvat dehidrojenaz (PDH) tarafından katalize edilir (Randle, 1986). PDH enzimi pirüvat dehidrojenaz kinaz (PDK) enzimi ile kontrol altında tutulmaktadır. PDK ise pirüvat tarafından ya da asetil KoA'nın azalması ile inhibe olur (Kerbey ve ark., 1976, Whitehouse ve ark., 1974) (Şekil 1.5).

Oluşan asetil KoA sitrata dönüşerek sitrik asit döngüsüne [Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü] girer. Bu döngüde ortaya çıkan NADH ve FADH<sub>2</sub>'ler elektron taşıma zincirine (ETZ) elektron iletir ve ATP üretimi gerçekleştirilmiş olur.



**Şekil 1.5.** Karbohidrat Metabolizması

ETZ: Elektron Taşıma Zinciri, GLUT: Glukoz Taşıyıcı Protein, HK: Heksokinaz, LDH: Laktat Dehidrojenaz, PDH: Pirüvat Dehidrojenaz, PFK: Fosfofruktokinaz, PK: Pirüvatkinaz, TCA: Trikarboksilik Asit

### 1.6.2. Yağ Asidi Metabolizması

Yağ asidleri hüce içine CD36'lar (Yağ Asidi Taşıyan Protein) aracılığı ile *flip-flop* hareketi yaparak girerler (Hamilton, 2007). *Fatty Acid Translocase/ Cluster of Differentiation 36* (FAT/CD36) ya da kısaca CD36 önceden adipozitlerde hüce içine yağ asidi almakla görevli oldukları bilinen, ardından yağ asidi metabolizmasındaki bu görevlerinin kardiyak hücrelerde ve iskelet kasında da aynı şekilde olduğu tespit edilen taşıyıcı proteinlerdir (Van Nieuwenhoven ve ark., 1995). Adipozitlerde, kalp ve iskelet kası hücrelerinde yağ asitlerinin hüce içine alınmasının %70'inden



sorumludurlar (Abumrad ve Goldberg, 2016; Glatz ve ark., 2016 ve Luiken ve ark., 2003). CD36 genleri silinmiş fare kalplerinden izole edilen kardiyomiyositlerde (Habets ve ark., 2007), fare kalbinde yapılan in vivo çalışmalarda (Abumrad ve Goldberg, 2016) ve iskelet kası ve adipoz dokuda (Abumrad ve Goldberg, 2016) hücre içine yağ asidi alımının azalmış olduğu ve bu azalmaya yağ asidi oksidasyonunun azalmasının da eşlik ettiği tespit edilmiştir.

CD36'lar, yağ asidinin hücre içinde yağ asidi bağlayan proteine (FABP) bağlanmasını kolaylaştırır. Hücrede FABP sentezlenmemesi durumunda hücre içine yağ asidi alınması durmaktadır (Van Nieuwenhoven ve ark., 1998). FABP'ye bağlanan yağ asidi, (FAS) yağ açıl-KoA sentaz enzimi ile yağ açıl-KoA'ya dönüştürülmektedir. Yağ açıl-KoA'lar mitokondri dış membranındaki karnitin açıltransferaz 1 (CPT) aracılığı ile yağ açıl karnitine dönüştürmektedir. Dış membrandan iç membrana açıl karnitin translokazlar aracılığı ile taşınan yağ açıl karnitin, mitokondri iç membranında CPT2 aracılığı ile tekrar yağ açıl-KoA'ya dönüşmektedir. Bu dönüşümlerin nedeni yağ açıl KoA'nın mitokondri membranını aşamamasıdır (Kerner ve Hoppel, 2000 ve Lopaschuk ve ark., 1994). Mitokondri içine alınan yağ açıl-KoA'lar  $\beta$ -oksidasyona uğrayarak iki karbonlu asetil KoA'ya dönüşürler. Asetil KoA ise tıpkı glukoz oksidasyonundaki gibi sitrik asit döngüsüne katılır ve ATP üretilir (Şekil 1.6).

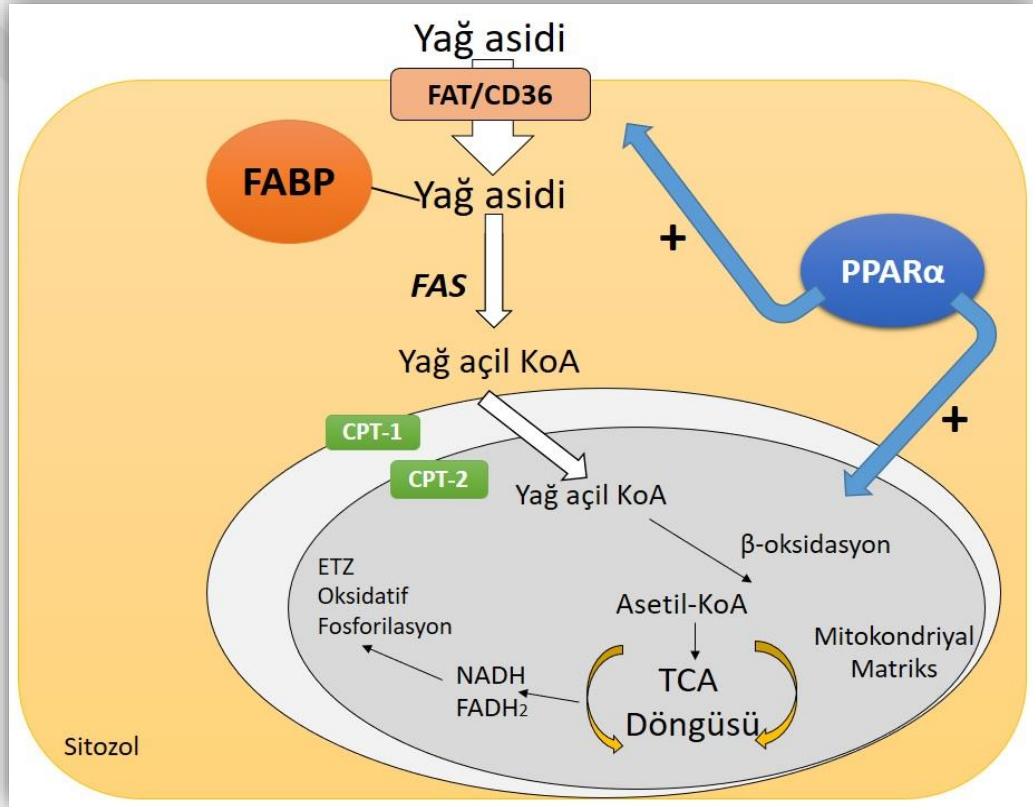
CD36'lar hücrede endozomlarda depolanabilirler; iskelet kası ve kalp kasında CD36'ların %50'si endozomlardadır (Bonen ve ark., 2000 ve Luiken ve ark., 2002). Kas kasılması durumunda ya da insülin stimülasyonu ile endozomlardaki CD36'lar membrana doğru hareket etmekte ve hücre içine yağ asidi alımı yaklaşık iki katına çıkmaktadır (Bonen ve ark., 2000 ve Luiken ve ark., 2003). Kontraksiyon aracılı CD36 translokasyonu AMPK (Adenozin Monofosfat ile Aktive Olan Protein Kinaz) ile tetiklenmektedir (Luiken ve ark., 2003). Bu translokasyon GLUT translokasyonuna benzemektedir. Artan kas kasılması ya da insülin uyarısı ile hem

GLUT4 hem de CD36'lar sarkolemmaya alınmaktadır, böylece glukoz ve yağ asidi oksidasyonunun artması hedeflenmektedir (Glatz ve ark., 2010). CD36'nın bu döngüsü iskelet kası ve adipoz dokuda da görülmektedir (Aguer ve ark., 2010; Aguer ve ark., 2011 ve Lobo ve Bernlohr, 2007).

CD36 proteini, lipid absorpsiyonunun çok olduğu bağırsaklarda, lipid akümülyasyonunun birincil sorumlusu adipoz dokuda, substrat olarak yağ asitlerini çoklukla kullanan kalp ve iskelet kasında fazla sentezlenmektedir. CD36 ekspresyonu nükleer reseptör ailesi olan PPAR'lar (Peroksizom Proliferatör ile Aktifleştirilen Reseptör) tarafından kontrol edilmektedir. PPAR $\alpha$ 'nın çok sentezlendiği dokularda yağ asidi katabolizması da fazla olmaktadır. PPAR'lar heterodimer oluşturarak Retinoid X reseptörüne ve PPAR cevap elementine bağlanmaktadır; böylece transkripsiyonu düzenleyebilmektedirler (Neels ve Grimaldi, 2014).

PPAR'lar iskelet kası, karaciğer, bağırsak, böbrek ve kalp dokularında yoğunlukla bulunan (Abbott, 2009 ve Su ve ark., 1999); temelde yağ asidi taşınması, esterifikasyonu ve oksidasyonundan sorumlu protein ailesidir (Barger ve ark., 2000, Finck, 2007). PPAR $\gamma$  adipojeneziste görevliken (Lowell, 1999); PPAR $\alpha$  yağ asidi oksidasyonunun kontrolünde önemli etkiye sahiptir (van Raalte ve ark., 2004). Metabolik ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir hedef protein grubudur. Örneğin fibratlar, metabolik sendromla ilişkili mikrovasküler komplikasyonları önlemek için kullanılan PPAR $\alpha$  ligandlarıdır (Liss ve Finck, 2017). PPAR $\gamma$  agonistleri olan tiazolidindionlar ise hiperglisemi, anjiyenezis ve kardiyak fibrozis kontrolünde oldukça etkilidirler (Lim ve ark., 2015 ve Nagy ve ark., 1998). Yararlı etkilerinin yanı sıra PPAR $\alpha$  kalpte glukoz metabolizmasından yağ asidi metabolizmasına doğru kaymaya sebep olduğu için; reaktif oksijen türlerinin birikimine ve lipotoksisiteye neden olmaktadır.

Yağ asitleri ve yağ asidi metabolitleri PPAR'ların doğal ligandlarıdır (Georgiadi ve Kersten, 2012 ve Grimaldi ve ark., 1999). PPAR $\alpha$ 'nın ekspresyonlarının artması kalpte ve iskelet kasında yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonunu ve hücre içine yağ asidi alınmasına sebep olan CD36 ve FABP ekspresyonunu artırmaktadır (Şekil 1.6). PPAR $\alpha$  genleri silinmiş fare kalbinde yağ asidi kullanımı azalırken (Djouadi ve ark., 1998, Peters ve ark., 1997); PPAR $\alpha$  aşırı üretimi yağ asidi kullanımını artırmıştır (Finck ve ark., 2002). CD36 genleri silinmiş ve PPAR $\alpha$  aşırı üretimi gerçekleştirilmiş olan kalplerde ise yağ asidi kullanımı önlenmiştir (Yang ve ark., 2007).



**Şekil 1.6.** Yağ Asidi Metabolizması

CPT: Karnitin Palmitoil Transferaz, ETZ: Elektron Taşıma Zinciri, FABP: Yağ Asidi Bağlayan Protein, FADH<sub>2</sub>: Flavin Adenin Dinükleotid, FAS: Yağ Açıl Sentaz, FAT/CD36: Yağ Asidi Taşıyan Protein, NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid, PPAR $\alpha$ : Peroksisom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör Alfa, TCA: Trikarboksilik Asit

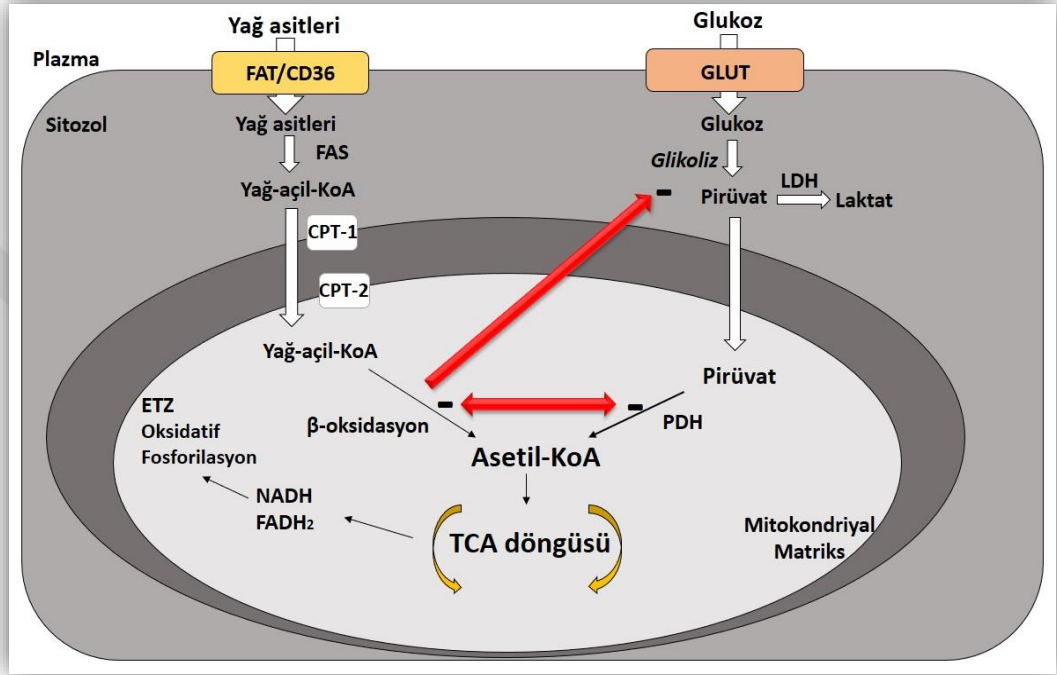
### 1.6.3. Randle Döngüsü ve Bu Döngünün Tedavideki Yeri

Randle döngüsü, glukoz ve yağ asitlerinin mitokondride oluşan ortak metabolitleri aracılığı ile birbirlerinin kullanımlarını baskılamaları durumudur; hücrede glukoz kullanımı arttıkça yağ asidi kullanımının azalacağı şeklinde de yorumlanabilir (Randle ve ark., 1963) (Şekil 1.7). Bu dengede her iki substratın da katabolizma süreçlerinde açığa çıkan metabolitlerin negatif geri-bildirim (*feedback*) etkileri rol oynamaktadır. Yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonundan açığa çıkan asetil-KoA ve NADH, PDH enzimini inhibe etmektedir. Benzer şekilde sitrat, glikoliz enzimlerinden PFK enzimini ve nispeten daha az olarak HK enzimini inhibe eder (Randle ve ark., 1963). PDH'nin inhibisyonu yağ asidi oksidasyon oranını en çok artıran durumdur.

Yağ asidi oksidasyonunun artması glikoliz ve glukoz oksidasyonu (pirüvat oksidasyonu) kenedinin bozulmasına yol açmaktadır. Pirüvatın, mitokondri iç membranına transfer olabilmesi için bir protonun da stekiyometrik olarak ko-transfer olması gerekmektedir (Halestrap ve ark., 1990 ve Poole ve Halestrap, 1993). Bu nedenle glikoliz ve glukoz oksidasyonunun dengesi bozulduğunda glikolitik hidroliz sonucunda açığa çıkan proton, iç membranına ko-transfer olamaz; bu durum asidozise sebep olur (Dennis ve ark., 1991 ve Robergs ve ark., 2004).

Benzer şekilde glukoz oksidasyonunun artması ile açığa çıkan asetil-KoA da 3-ketoaçil-KoA üzerinde inhibitör *feedback* etki göstererek yağ asidi oksidasyonun azalmasına neden olmaktadır. Glukoz oksidasyonu sırasında açığa çıkan NADH, açil-KoA dehidrojenaz ve 3-hidroksiaçil-KoA dehidrojenaz üzerinde inhibitör etki göstermektedir. Ayrıca glukoz metabolizması ile açığa çıkan asetil-KoA, CPT ve asetil-KoA karboksilaz enzimleri aracılığı ile sitozolik malonil-KoA sentezinin

artmasına neden olmaktadır; malonil-KoA hücre içine yağ asidi alımının ve yağ asidi oksidasyonunun negatif düzenleyicisidir (Lysiak ve ark., 1986 ve Stanley ve ark., 2005). Glukoz oksidasyonunun artması; glikoliz-glukoz oksidasyon kenedinin düzenli çalışmasını, ortamdaki protonun azalmasını ve dolayısı ile kardiyak etkililiğin artmasını sağlamaktadır.



**Şekil 1.7.** Randle Döngüsü.

CPT: Karnitin Palmitoil Transferaz, ETZ: Elektron Taşıma Zinciri, FADH<sub>2</sub>: Flavin Adenin Dinükleotid FAS: Yağ Açıl Sentaz, FAT/CD36: Yağ Asidi Taşıyan Protein, GLUT: GLukoz Taşıyıcı Protein, NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid, PDH: Pirüvat Dehidrojenaz, TCA: Trikarboksilik Asit

### 1.7. Diyabetik Kardiyomiyopatide Görülen Metabolik Bozukluklar

İnsülin rezistansı veya diyabet durumlarında kalp, enerji metabolizmasını hızlı bir şekilde düzenler. Bu, yağ asidi tüketiminin artması ve glukoz kullanımının

azalması ile sonuçlanan bir modifikasyondur (Lopaschuk, 1989; Lopaschuk ve ark., 1994 ve Lopaschuk, 2002). Son yıllarda diyabetik kardiyomiyopatinin metabolik değişimlerin bir sonucu olduğu fikri oldukça kabul görmektedir. Örneğin streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabette kardiyak metabolizmanın dördüncü günden itibaren bozulduğu tespit edilmiştir (Ghosh ve ark., 2004).

STZ-diyabet modeli kullanarak yapılan çalışmalarda ATP'nin neredeyse tamamının yağ asitlerinden karşılandığı, glukoz kullanımının dramatik olarak düştüğü gözlenmiş ve bu durumun kalbin fonksiyonel bozukluğunun sebeplerinden biri olduğu düşünülmüştür (Severson, 2004; Stanley ve ark., 1997; Taegtmeyer ve ark., 2002 ve Young ve ark., 2002). Diyabetik sıçanlarla yapılan bir çalışmada PPAR $\alpha$  ekspresyonunun tetiklendiği ve hücre içine yağ asidi alımının ve yağ asidi oksidasyonunun arttığı gözlenmiştir (Finck ve ark., 2002). Yağ asidi oksidasyonu glukoz oksidasyonuna göre kalbin daha çok enerji kullanmasına sebep olur; bu da enerjinin verimsiz kullanılmasından ötürü kardiyak verim (*efficiency*) azalmaktadır. (Kardiyak verim = Kardiyak iş/ miyokardiyal oksijen tüketimi). Diyabette ve obezitede bu durum gerçekleştiği için kardiyak verim azalmaktadır (How ve ark., 2006; Mazumder ve ark., 2004 ve Peterson ve ark., 2004).

İnsülin rezistansı ya da diyabet gibi hastalıklarda glukoz kullanımını artırmak - insülin bağımsız da sağlanabilen- tercih edilir bir durumdur (Koh, 2016). İnsülin rezistansının gelişmesine hücre içine alınan ve kullanılmadan hücre içinde biriken lipidlerin katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Kitessa ve Abeywardena, 2016). Bu durumda yağ asitlerinin hücre içine alınmasını veya yağ asidi oksidasyonunun azalmasını sağlamak diyabetik kardiyomiyopati için bir tedavi yaklaşımı olabilecektir.

Yüksek yağlı diyet kardiyak dokuda ve iskelet kasında lipit birikimine neden olmaktadır. Kronik bir şekilde yüksek miktarda yağ asidi alınması CD36'nın hücre içindeki hareketini hızlandırmaktadır ve CD36'nın endozomdan sarkolemmaya kalıcı olarak geçmesine sebep olmaktadır. Sıçanlarda yüksek yağlı diyeti takip eden üç gün içinde miyosellüler yağ asidi alımı artmaktadır (Bonen ve ark., 2015). Yağ asitlerinin bu artışı intramiyosellüler triaçilgliserollerin, diaçilgliserollerin ve seramidlerin formlarının bozulmasına neden olmaktadır. Bu metabolitler GLUT translokasyonunu bozarak insülin sinyalinin inhibe ederler. Bu da hücre içine glukoz alımının azalmasına ve glukozun glikojen olarak depolanmasının azalmasına neden olmaktadır. Böylece kalp ve iskelet kasında insülin rezistansı başlar, kontraktıl fonksiyon bozulmaktadır (Bonen ve ark., 2015 ve Glatz ve ark., 2016).

### **1.8. $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Metabolik Etkileri**

Diyabet gibi metabolik ve kardiyovasküler bileşenler içeren hastalıklarda ve diğer kardiyak fonksiyon bozukluğu gözlenen modellerde  $\beta$ arr proteinlerinin rolü her geçen gün daha fazla ortaya çıkmaktadır. Çeşitli deneysel modeller kullanılarak yapılan bir çalışmada  $\beta$ arr2 ile insülin rezistansı arasında güçlü bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Luan ve ark., 2009). Tip 2 diyabet modelleri olan db/db farelerde ve yüksek yağlı diyet ile indüklenmiş fare modelinde (HFD, *high fat diet*) karaciğer ve iskelet kaslarında  $\beta$ arr2 protein ve mRNA düzeylerinin az olduğu; daha az belirgin olmak üzere  $\beta$ arr1'in de düşük olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada kliniklerden elde edilen karaciğer örneklerinde de hem  $\beta$ arr1'in hem de  $\beta$ arr2'nin düşük olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar  $\beta$ arr2 genleri silinmiş farelerde glukoz kullanımının azaldığını ve insülin toleransının bozulduğunu; db/db farelere adenovirüsle  $\beta$ arr2 uygulamasının ise glukoz toleransını düzelttiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada,  $\beta$ arr2'nin insülinin reseptörüne bağlandıktan sonra Akt-PI3K-

Glikojen Sentaz Kinaz-3 $\beta$  yolağının aktivasyonu için gerekli olduğu ve bunun Src aracılığı ile gerçekleştiği bulunmuştur. Bu bulgular,  $\beta$ arr2'nin anti-diyabetik etkileri olabileceğini düşündürmektedir (Luan ve ark., 2009). Benzer modellerde [insan  $\beta$ arr1 ekspresyonunu indükledikleri transjenik ( $\beta$ arr1-tg) ve  $\beta$ arr1 genleri silinmiş fareler ile bunların kontrolleri] yapılan bir çalışmada serum lipidleri, kilo alma profilleri, obeziteye çoğunlukla eşlik eden serum leptin düzeyleri ve glukoz toleransı gibi parametreleri incelemişler ve  $\beta$ arr1 proteininin obezite gelişmesini baskıladığını ve genleri silinmiş farelerin diyetle indüklenen obeziteye daha yatkın olduklarını bildirmişlerdir (Zhuang ve ark., 2011b). Bu çalışmada ayrıca adipozit farklılaşması, lipid metabolizması ve inflamasyon ile ilişkili bazı genlerin ekspresyonları incelenmiştir. Artan yağ kütlesi ve adipozit büyüklüğüyle uyumlu olarak, yüksek yağ diyetiyle beslenen  $\beta$ arr1 genleri silinmiş farelerin beyaz adipoz dokularında FABP, CD36 ve lipoprotein lipazın arttığı gösterilmiştir. Yüksek yağ ile beslenen  $\beta$ arr1 genleri silinmiş farelerin adipoz dokularında makrofaj infiltrasyonunun ve inflammatuar mediyatörlerin artışıyla örtüşür şekilde TNF, nitrik oksid sentaz-2 (indüklenebilir Nitrik Oksid Sentaz) ve monosit kemoatraktan protein-1'in de arttığı gösterilmiştir. Gerek lipid metabolizmasında gerekse inflamasyonda görevli bu genlerin ekspresyonlarının  $\beta$ arr1-tg farelerde azalması,  $\beta$ arr1'in diyetle indüklenen obeziteyi ve obeziteden kaynaklanan insülin rezistansı ve inflamasyonu engellediği şeklinde yorumlanmıştır (Zhuang ve ark., 2011b).

Araştırmacılar çalışmanın devamı olarak  $\beta$ arr1'in PPAR $\gamma$  ile etkileşerek gen transkriptionunu etkilediği göstermişlerdir. Buna göre  $\beta$ arr1 PPAR $\gamma$  ile bir kompleks oluşturmaktadır ve bu etkileşim PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  (stimulator) heterodimerinin fonksiyonunu azaltırken PPAR $\gamma$ /NCoR (repressör) heterodimerinin fonksiyonunu artırmaktadır (Zhuang ve ark., 2011a). Bu veri,  $\beta$ arr1'in, PPAR $\gamma$  komplekslerinin aktive eden ya da baskılayan anahtar bir protein rolünde olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada  $\beta$ arr1 genleri silinmiş,  $\beta$ arr1-tg, ve kontrol hayvanlardan hazırlanan ve embriyonik fibroblast hücrelerin deneysel olarak farklılaşmasıyla oluşturulmuş adipozitlerde FABP4, CD36, lipoprotein lipaz ve yağ asidi sentazın mRNA düzeyleri  $\beta$ arr1 ile korelasyon göstermiştir. Bu adipojenik



genlerin mRNA'ları  $\beta$ arr1 genleri silinmiş hücrelerde belirgin olarak yükselmişken,  $\beta$ arr1-tg hücrelerde azalmıştır.

Bağırsak enteroendokrin hücrelerinden salıverilen ve pankreas  $\beta$  hücrelerin insülin salıvermesini düzenleyen GLP-1 (glukagon benzeri peptid-1) reseptörleri de GPCR ailesindedir.  $\beta$ arr proteinlerinin bu reseptörden kaynaklanan sinyalizasyona katılımının insülin sentezleyen pankreatik INS-1 hücre kültürlerinde incelendiği bir çalışmada araştırmacılar koimmünopresipitasyon yöntemiyle GLP-1 reseptörü ve  $\beta$ arr1'in fiziksel olarak etkileştiğini göstermişlerdir (Sonoda ve ark., 2008).  $\beta$ arr1'in susturulması, GLP-1 sinyalizasyonunu azaltmış, ERK ve CREB aktivasyonu ve insülin reseptör substratı ekspresyonunu azaltmıştır. GLP-1 zamana bağlı olarak INS-1 hücrelerin insülin reseptör substratı-2 proteininde artışa yol açmıştır. Bu çalışmada ayrıca GLP-1'in insülin salıverici etkisine kısmen aracılık ettiği bilinen PKA-cAMP yolağına  $\beta$ arr1'in ne ölçüde ettiği incelenmiş ve  $\beta$ arr1'in susturulması ile cAMP düzeyinin ve insülin salıverilmesinin azaldığı gösterilmiştir (Sonoda ve ark., 2008). Bu çalışmalar,  $\beta$ arr1'in insülin salıverilmesi, insülin etkisi ve duyarlılığını etkileyen çok fonksiyonlu bir protein olduğunu göstermektedir ve karvedilolün metabolik avantajlarının mekanizmasının da  $\beta$ arr-aracılı etkilerinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündüren faktörlerden biridir.

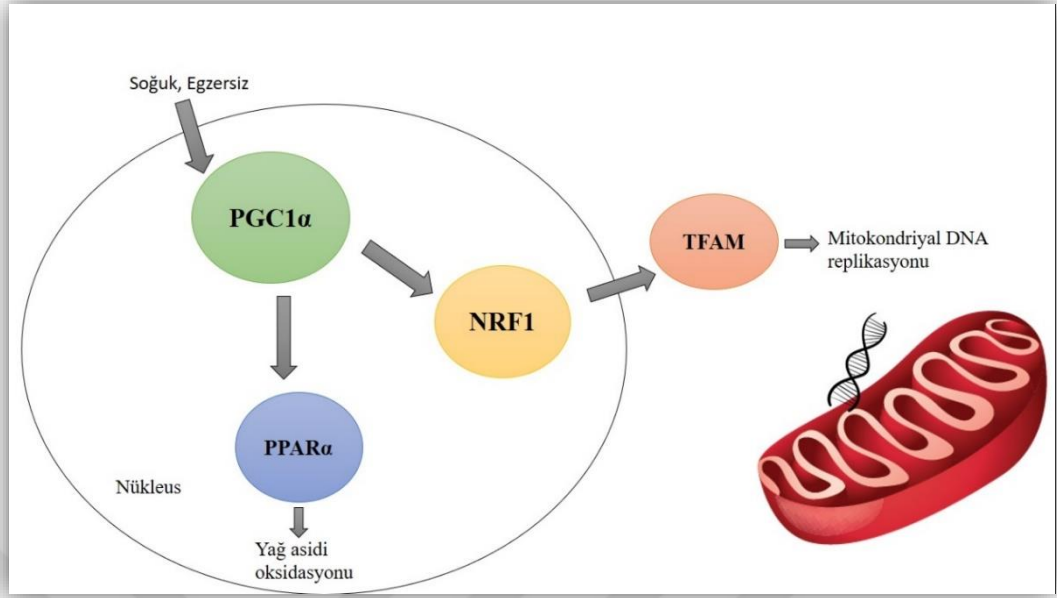
Glukoz ve yağ metabolizması üzerindeki doğrudan etkileri, miyosit hücre kültürlerinde incelendiğinde karvedilolün glikolizi stimüle ederken yağ asidi oksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Onay-Besikci ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında karvedilolün bu etkisine  $\beta$ arr *biased* agonist olmasının katkısı araştırılmıştır.

## 1.9. Mitokondriyal Biyojenez

Mitokondriyal biyojenez, mitokondrinin kütlece büyümesi ve çoğalması anlamına gelen, oksijen kullanımının arttığı aç kalma, egzersiz, oksidatif stres ve hücre yenilenmesi gibi durumlara adaptasyon için gerekli olan bir süreçtir (Jornayvaz ve Shulman, 2010).

Mitokondriyal biyojenez kusurları diyabet ve insülin direnci durumlarında hem kas hem de adipoz dokuda gözlenen glukoz ve yağ metabolizması bozukluklarına eşlik eden sorunlardır (Choo ve ark., 2006; Lowell ve Shulman, 2005 ve Sivitz ve Yorek, 2010). İnsülin duyarlılığını artıran ilaçların adipoz dokudaki etkileri arasında mitokondriyal biyojenezi artırmaları da bulunmaktadır (Wilson-Fritch ve ark., 2003).

Mitokondriyal biyojenez büyük ölçüde PPAR $\gamma$  koaktivatörü PGC1 $\alpha$  (Peroksisom Proliferatör ile Aktifleştirilen Reseptör Gama Koaktivatör1-alfa) tarafından kontrol edilmektedir. Ekspresyonu  $\beta_3$ -AR'nin uyarılması ile tetiklenmekte olan PGC1 $\alpha$  (Puigserver ve ark., 1998), PPAR $\gamma$  ve PPAR $\alpha$ 'nın yanı sıra nükleer transkripsiyon faktörleri olan NRF1 ve NRF2'nin (Nükleer Solunum Faktörü) de kofaktörüdür. Bu faktörler mitokondri çoğalmasının ve oksidatif fosforilasyonla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlemektedirler (Duncan ve ark., 2007; Wu ve ark., 1999). NRF-1 aynı zamanda mitokondriyal DNA transkripsiyonunu ve çoğalmasını düzenleyen TFAM'ı (mitokondriyal DNA transkripsiyon faktörü A) aktive etmektedir (Scarpulla, 2002 ve Wu ve ark., 1999). TFAM mitokondriye transfer olur; mitokondriyal DNA replikasyonu ve mitokondriyal gen ekspresyonlarını tetikleyerek biyojenezi stimüle eder (Garesse ve Vallejo, 2001 ve Larsson ve ark., 1998) (Şekil 1.8).



**Şekil 1.8.** Mitokondriyal Biyojenez

NRF1: Nükleer Solunum Faktörü-1, PGC1 $\alpha$ : Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör Gama Koaktivatörü Alfa, PPAR $\alpha$ : Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör Alfa, TFAM: Mitokondriyal Transkripsiyon Faktörü-A

PPAR $\gamma$ 'nın koaktivatörü olan PGC1 $\alpha$ , iskelet ve kalp kasında termojenizis, mitokondriyal biyojenizis, glukoz ve yağ asidi metabolizması gibi süreçlerde görevlidir (Puigserver ve ark., 1998). PGC1 $\alpha$  mitokondrinin bol olduğu ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyonun fazla yapıldığı dokularda (kahverengi adipoz doku, kalp ve iskelet kası gibi) çok bulunmaktadır (Cannon ve ark., 1998). Soğuk ya da aşırı beslenme gibi çevresel stres faktörlerinde adaptif rol oynayan ve termojeniziste en çok rol alan iki doku olan kahverengi adipoz doku ve iskelet kasında, yağ asidi oksidasyonu ve mitokondriyal biyojenizin tetiklenmesine neden olmaktadır.

Kalp ihtiyaç duyduğu ATP'nin büyük bir kısmını yağ asidi oksidasyonundan sağlamaktadır. Kalpte PGC1 $\alpha$  ekspresyonları arttığı zaman mitokondriyal biyojeniz ve oksidatif fosforilasyon artmaktadır. İn-vitro ortamda kardiyak miyositlerde PGC1 $\alpha$  ekspresyonlarının yükselişinin mitokondriyal biyojeniz ve oksidatif fosforilasyonu artırdığı (Lehman ve ark., 2000); adipozit ve C2C12 miyoblastlarda

ise oksidatif fosforilasyon kenedinin bozulduđu bilinmektedir (Wu ve ark., 1999). Kalpte deneysel hipertrofi oluřturulduđunda PGC1 $\alpha$  seviyelerinin dűřtűđű gűzlenmiřtir (Sack ve ark., 1997 ve Sano ve ark., 2004).

Normalde karaciđerde dűřűk miktarlarda bulunan PGC1 $\alpha$ 'nın ekspresyonları yemek yeme ile artmaktadır. Bu durum hepatik glukoneojenezin ve yađ asidi oksidasyonunun artmasına sebep olan çeřitli transkripsiyon faktűrleri ile fosfoenolpirűvat karboksikinaz ve glukoz-6-fosfataz gibi glukoneojenik enzimlerin artmasına neden olmaktadır. Açlık durumunda bu proteinin ekspresyonu ile glukoz oksidasyonundan yađ asidi oksidasyonuna bir kayma gűzlenmektedir; bűylece glukoz sinir sistemi için saklanmaktadır (Herzig ve ark., 2001 ve Yoon ve ark., 2001). PGC1 $\alpha$  ekspresyonlarındaki artıřın iskelet kasında GLUT4 ekspresyonlarında artıřa neden olduđu gűsterilmiřtir (Baar ve ark., 2002 ve Michael ve ark., 2001).

Tip 2 diyabet hastalarının iskelet kaslarında PGC1 $\alpha$  ekspresyonlarının azaldıđı gűrűlműřtir (Mootha ve ark., 2003; Patti ve ark., 2003 ve Petersen ve ark., 2004). Tiazolidindion grubu oral antidiyabetik ilaçların PGC1 $\alpha$  aktivitesini artırarak mitokondriyal biyojenezi ve mitokondri fonksiyonunu artırdıđı bilinmektedir (Wilson-Fritch ve ark., 2004).

Mitokondriyal biyojenezin endotel hűcrelerde karvedilol tarafından stiműle edildiđini gűsteren bir çalıřmada, karvedilolűn bu etkisine PGC-1 $\alpha$ , NRF1 ve TFAM dűzeylerindeki artıř eřlik etmektedir (Yao ve ark., 2016). Hala metabolik etki mekanizması bilinmiyor olmakla birlikte, karvedilolűn de bir diđer 3. kuřak  $\beta$ -blokűr olan nebivolol gibi mitokondriyal biyojenezi stiműle ettiđinin gűsterilmesi, bu ilaçların dođrudan metabolik etkileri olabileceđine iliřkin en yeni ve gűlű verilerden biridir (Huang ve ark., 2013 ve Yao ve ark., 2016). Yao ve arkadaşlarının 2016

yılında yayımladıkları çalışma endotel hücre serisi olan HUVEC hücrelerde gerçekleştirilmiştir ve karvedilolün vasküler etkilerinin tanımlanması anlamında önemlidir.

Karvedilol, insülin rezistansı ve diyabeti engellemek gibi onu diğer  $\beta$  blokör ilaçlardan ayıran özelliklere sahip kardiyovasküler bir ilaçtır. Hücre içindeki bazı etkilerine  $\beta$ arr proteinleri aracılık etmektedir (Wisler ve ark., 2007) ve  $\beta$ arr proteinleri insülin rezistansı ve obezite ile yakından ilişkilidir (Luan ve ark., 2009 ve Zhuang ve ark., 2011b). Karvedilolün kardiyovasküler sistemdeki yararlı etkilerinin, metabolik etkilerinden kaynaklandığını ve bu metabolik etkilerin ise  $\beta$ arr proteinleri aracılığı ile ortaya çıktığını hipotez ederek oluşturulan bu tez çalışmasının amacı karvedilolün etki mekanizmasını  $\beta$ arr proteinleri çerçevesinde ortaya koymaktır. Bu amaca yönelik olarak, hem metabolik anomalilere hem de kardiyovasküler hasara yol açan deneysel diyabet modeli kullanılarak karvedilolün diyabetik hasarı tedavi edici etkisi değerlendirilmiş, karvedilolün etkileştiği  $\beta$ arr proteinlerinin diyabetten ve karvedilol uygulamasından nasıl etkilendikleri belirlenmiş, karvedilolün substrat metabolizması üzerine etkileri ve bu etkilerin mekanizması belli başlı metabolik yollar ve proteinler düzeyinde tespit edilmiş, karvedilolün metabolik etkilerine  $\beta$ arr proteinleriyle olan etkileşiminin katkısı incelenmiştir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Gereçler

#### 2.1.1. Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 2.1’de listelenmiştir.

**Çizelge 2.1.** Cihazlar

Kullanılan Malzeme	Marka-Model
Tail-cuff sistemi	Commat
Veri Kayıt ve Analiz Sistemi	MP100 Biopac-Systems,Inc
Stimülatör	Grass, S44
Akış ölçer	Transonic Systems, TS410
%95 O <sub>2</sub> %5 CO <sub>2</sub> içeren gaz karışımı	Antgaz
Kan şekeri ölçüm cihazı	ACCU-CHEK® Performa
Buz makinesi	Hoshizaki FM120DE
Otoklav	ALP
Santrifüj	Hettich, Rotina 35R
Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich, Micro200R
Dikey elektroforez	Bio-Rad
Güç kaynağı	Bio-Rad
Orbital çalkalayıcı	Yellow line
Kuru ısıtıcı	Major science
Laminer akış kabini	Holten
İnkübatör	Sanyo
Mikroplak okuyucu	Spektramax 190
pH metre	Isolab, Mettler Toledo
Manyetik karıştırıcı	Isolab, Heidolph

**Çizelge 2.1.** Cihazlar (devam)

Kullanılan Malzeme	Marka-Model
Kaba terazi	Scaltec, SBA61
Hassas terazi	Kern
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorff, Gilson, Microlit
Etüv	Blue Pard, PH050A
<i>Inverted</i> mikroskop	Leica
Vortex	Velp Scientifica
Hücre kazıyıcı ( <i>Cell Scraper</i> )	Greiner

### 2.1.2. Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.2’de listelenmiştir.

**Çizelge 2.2.** Kimyasal Maddeler

KİMYASAL	MARKA	KATALOG NO
Sıçan yemi	Purina	-
STZ	Sigma	#S0130
İzoprenalin	Sigma	#I5627
Heparin	Nevparin, Mustafa Nevzat	-
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Merck	#317275
Proteaz inhibitör kokteyli	Cell Signaling Technologies	#5871
Sodyum ortovanadat	Sigma	#450243
RIPA (Radyoimmünopresipitasyon tampon çözeltisi)	VWR Life Science	# 97063-270
BCA (Bikinkoninik asit) protein miktar tayini kiti	Thermo Fisher Scientific	#23225
%30 Akrilamid/Bis solüsyonu (5:1)	Bio-Rad	#161-0158
Amonyum persülfat (APS)	Bio-Rad	#1610700
TEMED (Tetrametiletildiamin)	Bio-Rad	#1610801
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Bio-Rad	#1610302

**Çizelge 2.2.** Kimyasal Maddeler (devam)

KİMYASAL	MARKA	KATALOG NO
Yükleme jel solüsyonu	Bio-Rad	#161-0799
Ayırıcı jel solüsyonu	Bio-Rad	#161-0798
Tween20	Bio-Rad	#161-0781
Protein standardı	Bio-Rad	#161-0374
TBS (Tris/ tamponlanmış salin)	Bio-Rad	#1706435
TG (Tris/Glisin)	Bio-Rad	#161-0734
TGS (Tris/Glisin/SDS)	Bio-Rad	#161-0732
Metanol	LiChrosolv	#67-56-1
PVDF (Polivinilidin florür) membran	Bio-Rad	#162-0177
Nitroselülöz membran	Bio-Rad	#162-0112
BSA (Sığır serum albumini)	Equitech-Bio	#BAH66
ECL (Artırılmış kemilüminesans) reaktifi (Clarity)	Bio-Rad	#1705060
ECL Reaktifi (Clarity max)	Bio-Rad	#1705062
βarr1 siRNA	Santa Cruz Biotechnology	#sc-29742
βarr2 siRNA	Santa Cruz Biotechnology	#sc-29743
Kontrol siRNA	Santa Cruz Biotechnology	#sc-37007
siRNA transfeksiyon reaktifi	Santa Cruz Biotechnology	#sc-29528
siRNA transfeksiyon mediumu	Santa Cruz Biotechnology	#sc-36868
FBS (Fetal sığır serumu)	Biowest	#S1810
PBS (Fosfat tamponlu salin)	Biological Industries	# 02-020-1A
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , yüksek glukoz)	Biowest	#L0103
Penisilin-Streptomisin çözeltisi	Biowest	#L0018
Tripsin	HyClone	#SH30042.01
Tripan mavisi	Lonza	#17-942E
HK kolorimetrik aktivite ölçüm kiti	Sigma	#MAK091
PFK kolorimetrik aktivite ölçüm kiti	Sigma	#MAK092
PK kolorimetrik aktivite ölçüm kiti	Sigma	#MAK072



### 2.1.3. Antikorlar

Kullanılan antikorlar Çizelge 2.3'te listelenmiştir.

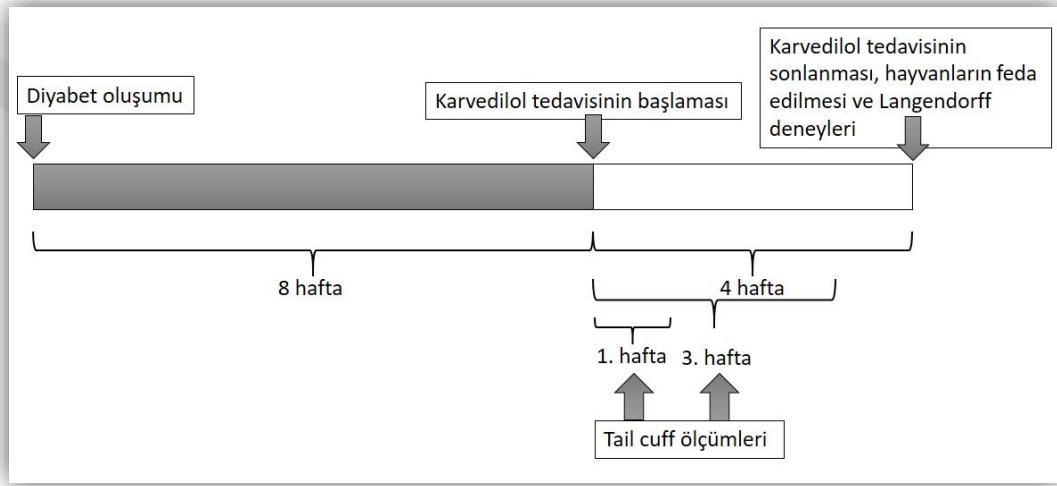
**Çizelge 2.3.** Antikorlar

ANTİKOR	MARKA	KATALOG NO
Fosforile-ERK (pERK)	Cell Signaling Technologies	#9101
Total-ERK (tERK)	Cell Signaling Technologies	#9102
$\beta$ arr1	Cell Signaling Technologies	#30036
$\beta$ arr2	Cell Signaling Technologies	#3857
TFAM	Thermo Fisher Scientific	#PA5-75926
GLUT1	Thermo Fisher Scientific	#PA1-1063
PGC1 $\alpha$	Thermo Fisher Scientific	#PA1-31202
PPAR $\alpha$	Thermo Fisher Scientific	#PA1-32484
CD36	Thermo Fisher Scientific	#PA1-16813
HRP ( <i>horseradish</i> peroksidaz) bağlı anti-tavşan ikincil antikor	Cell Signaling Technologies	#7074

### 2.2. Sıçanlarda Gerçekleştirilen Çalışmalar

Sekiz haftalık 200-250 g ağırlığında Sprague Dawley erkek sıçanlar Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden satın alınmıştır. Sıçanlar, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda, 22±1°C sıcaklıkta ve %30-70 nem oranına sahip steril ünitelerde barındırılmıştır. Bir hafta süre ile sıçanların deney ortamına alışmaları sağlanmıştır. Deney grupları her grupta bulunan sıçanların ortalama beden ağırlıkları benzer olacak şekilde oluşturulmuştur.

Deneylerde toplam 76 hayvan kullanılmıştır. Hayvanların bir bölümüne literatür bilgilerine uygun olarak 40 mg/kg, tek doz intraperitoneal (i.p) Enjeksiyonla STZ uygulanmıştır (Furman, 2015). Enjeksiyondan 72 saat sonra sıçanların kuyruklarından alınan kanla kan şekeri ölçülmüş, diyabet oluşumu doğrulanmıştır. Kan şekeri 300 mg/dl ve üzeri olan hayvanlar diyabet kabul edilmiştir. Hayvanların kan şekerleri ve beden ağırlıkları haftalık olarak takip edilmiştir. Diyabet oluşturulduktan sonra 12 hafta beklenerek sıçanlarda kardiyovasküler bozuklukların oluşması sağlanmıştır. Sekizinci haftadan itibaren karvedilol tedavisine başlanmıştır (Şekil2.1).



**Şekil 2.1.** Sıçanlarda Gerçekleştirilen İşlemler

Deney hayvanları Çizelge 2.4'teki gibi gruplandırılmış ve tedavi gruplarına dört hafta boyunca oral yolla 10 mg/kg/gün dozda (Huang ve ark., 2007) karvedilol uygulanmıştır. Kontrol ve STZ-diyabet grubuna karvedilolün süspansiyonu edildiği karboksimetil selülöz uygulanmıştır. 12 haftalık süresinin sonunda hayvanlar feda edililerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 2.4.** Deney Grupları

Gruplar	1.Set	2.Set
Kontrol Grubu (K)	6	10
Kontrol + karvedilol tedavisi (KK)	6	10
STZ-diyabetik (D)	8	14
STZ-diyabetik + karvedilol tedavisi (DK)	8	14

Çalışmalar iki set halinde tasarlanmıştır. Ön çalışmalar, diyabetik kardiyomiyopati oluşturulabilmesi ya da karvedilol ile tedavi edici etkinlik belirlenememesi durumunda deneysel düzenlemeler yapılabilebilmesi amacıyla tasarlanmıştır. Bu değerlendirme sonrasında gruplar ve tedavi protokolünde değişiklik yapılmasına gerek duyulmadığı ortaya çıkmış ve aynı gruplar ikinci sette yeniden oluşturulmuştur. Protokol değişikliği yapılmadığı için tüm sonuçlar her iki sette elde edilen verilerin birleştirilmesi ile analiz edilmiştir.

### 2.2.1. Kalp Atım Hızı ve Kan Basıncı Parametrelerinin Ölçülmesi

Tedavinin birinci ve üçüncü haftalarının sonunda kan basıncı ve kalp atım hızı parametreleri *Tail-cuff* metodu ile ölçülmüştür. Bu yöntemde göre sıçanlar öncelikle 15 dakika (dk) 35°C sıcaklıktaki özel dolaplarda bekletilmiş ve ardından hareketsiz kalmalarını sağlayacak küçük bölmelere (*restrainer*) alınmıştır. Manşet sıçanların kuyruklarına takılmış ve sistem otomatik kan basıncı aletine bağlanmıştır. *Cuff* otomatik olarak şişirildikten sonra boşalma esnasında sistolik ve diyastolik kan basıncı otomatik olarak kaydedilmiştir. Her ölçüm en az üç kere tekrarlanmış ve bu tekrarların ortalaması alınmıştır.

## 2.2.2. Langendorff Yöntemi ile Kalp Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

STZ-diyabet ve karvedilol tedavisinin kalp fonksiyonuna etkisi Langendorff perfüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Ketamin (90 mg/kg)/ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi edilen sıçanların göğüs kafesleri açılarak kalpleri çıkarılmış ve kalpler buzlu Krebs-Henseleit (Krebs: NaCl 120, NaHCO<sub>3</sub> 25, Glukoz 10, KCl 4,8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub> 1,25, CaCl<sub>2</sub> 1,25 mmol/L) çözeltisine konulmuştur. Daha sonra kalp, çevresindeki dokulardan temizlenmiş ve aortadan Langendorff kanülüne takılmıştır (Şekil 2.2). Kalpler sabit basınçta (75-80 mmHg), Krebs-Henseleit çözeltisi ile perfüze edilmiştir. Perfüzyon sıvısının sıcaklığı sirkülatörlü su banyosu kullanılarak 37°C'de, pH'sı ise %95 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> ile 7,4'te sabit tutulmuştur. Kalbin fonksiyonel performansının göstergelerinden olan sol ventrikül diyastolik basıncı (*left ventricular diastolic pressure*, LVDP), +dp/dt (Sol ventrikül kasılma hızı) ve -dp/dt (Sol ventrikül gevşeme hızı) değerlerini ölçmek için basınç ölçüm cihazına (*pressure transducer*) bağlı olan lateks balon sol ventrikül içine yerleştirilmiştir. Balonun içindeki hacim sol ventrikül diyastol sonu hacmi (*left ventricular end diastolic pressure*, LVEDP) 10 mmHg'ye ayarlanmıştır. Apeksine yerleştirilen elektrot ile kalpler dk'da 300 atım olacak şekilde uyarılmıştır. Bazal LVDP değerleri, kalplerin bu koşullarda 20 dk boyunca çalıştırılmasından sonra kaydedilmiştir. Bundan sonra artan dozlarda (10<sup>-11</sup> M-10<sup>-5</sup> M) izoproterenol uygulanarak kalplerin bu agoniste yanıtları incelenmiştir. Kalbe gönderilen perfüzyon artan akışa göre ayarlanmış ve dozlar yaklaşık olarak aşağıdaki miktarlarda kalbe ulaştırılmıştır:

10<sup>-11</sup> M 10 ml; 2,47x10<sup>-5</sup> µg

10<sup>-10</sup> M 12 ml; 2,964x10<sup>-4</sup> µg

10<sup>-9</sup> M 14 ml; 3,458x10<sup>-3</sup> µg

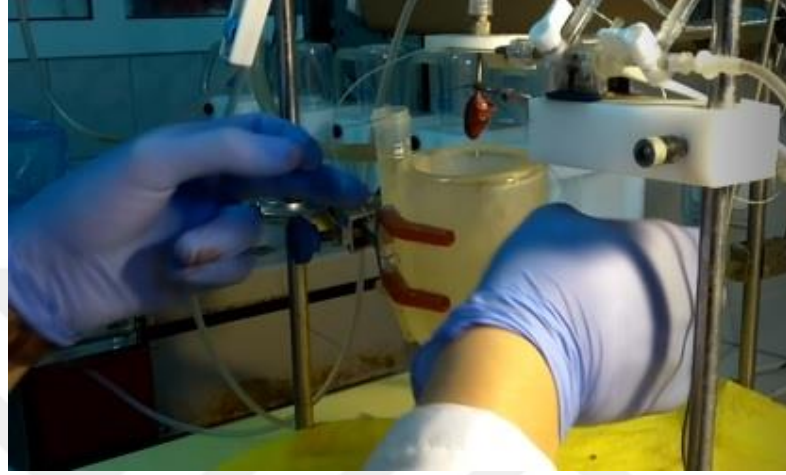
10<sup>-8</sup> M 16 ml; 3,952x10<sup>-2</sup> µg

10<sup>-7</sup> M 18 ml; 0,4446 µg

10<sup>-6</sup> M 20 ml; 4,94 µg

10<sup>-5</sup> M 22 ml; 5,434 µg

Krebs çözeltisi ile yıkanan kalplerde izoproterenol ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tüm parametreler bazal değerlere ulaştıktan sonra kalpler  $10^{-5}$  M karvedilol ilave edilmiş Krebs ile 10 dk perfüze edilmiştir. Böylece bu kalplerde karvedilolün olası akut etkileri de değerlendirilmiştir. LVDP,  $+dp/dt$ ,  $-dp/dt$  değerleri MP100 veri-kayıt sistemi ile kaydedilip sonrasında analizleri yapılmıştır.



**Şekil 2.2.** Kalbin Langendorff Sistemine Takılması.

### **2.2.3. $\beta$ Arrestin 1, $\beta$ Arrestin 2 ve ERK Miktar Tayinleri**

12 haftalık deney süresinin sonunda sıçanlardan izole edilen sol ventrikül ve iskelet kası dokularında  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 miktarları; sol ventrikül dokusunda ise  $\beta$ arr aktivasyonunun göstergelerinden biri olan ERK fosforilasyonu protein düzeyinde Western blot yöntemiyle incelenmiştir. STZ-diyabet ya da karvedilol tedavisinin bu proteinleri nasıl etkilediği saptanmıştır.

#### 2.2.4. Substrat Metabolizmasında Görev Alan Biyokimyasal Yolakların ve Proteinlerin İncelenmesi

Diyabette insülin eksikliği ya da insülinin dokularda yeterince kullanılmaması nedeniyle ortaya çıkan metabolik değişiklikler iyi karakterize edilmiştir (Fillmore ve ark., 2014 ve Samuel ve Shulman, 2016). Tip 1 diyabet modeli olan STZ-diyabetik sıçanlarda ortaya çıkan kardiyovasküler hasarlar ve metabolik değişiklikler de bilinmektedir.

Karvedilol tedavisi ile glukoz kullanımında ortaya çıkan değişikliklerin biyokimyasal mekanizmasının aydınlatılması için glikoliz hızını belirleyen PFK ve HK enzimleri ile bu yolağın geri-dönüşümsüz basamaklarından biri olan PK (Salway, 1999) enzimlerinin aktiviteleri incelenmiştir. PFK ve PK enzimlerinin aktiviteleri sol ventrikül ve çizgili kasta, HK enzim aktivitesi ise sol ventrikül dokusunda gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarda oluşan ürünler, kolorimetrik miktar tayini esasına dayanan kitler yardımıyla ölçülmüştür. STZ-diyabet ve karvedilol tedavisinin, glukoz taşıyıcıları üzerine etkisini değerlendirmek için GLUT-1 miktarları sol ventrikül ve iskelet kasında Western blot yöntemiyle değerlendirilmiştir.

STZ-diyabet ve karvedilol tedavisinin yağ asidi metabolizması üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yine sol ventrikül ve iskelet kası dokularında PPAR $\alpha$  ve CD36 miktarları Western blot yöntemiyle ölçülmüştür.

### 2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu çalışmalarda  $\beta$ -AR'lere ek olarak  $\alpha$ -AR'leri de taşıdıkları bilinen C2C12 hücreleri kullanılmıştır (Hsu ve ark., 2004 ve Ryall ve ark., 2010). C2C12 hücrelerinde karvedilol uygulamasının glikolizi stimüle ettiği ve yağ asidi oksidasyonunu baskıladığı daha önce gösterilmiştir (Onay-Besikci ve ark., 2012). Substrat metabolizmasındaki değişimlerin göstergesi olan proteinlerin karvedilolden nasıl etkilendiği bu hücre grubunda incelenmiş,  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 proteinlerinin susturulmalarının hücrelerin metabolizması üzerine etkisi değerlendirilmiş ve substrat metabolizmasında değişikliklere neden olan biyokimyasal yollar incelenmiştir.

Hücreler, üretici firmanın önerisi doğrultusunda %10 (v/v) serum, 100 U/ml penisilin G ve 100  $\mu$ g/ml streptomisin içeren ve bu hücreler için optimize edilmiş ortamda (yüksek glikozlu DMEM) inkübe edilmişlerdir. Yüze tutunma özelliğinde olan hücrelerin çoğaltılmaları standart yöntemlerle (tripsinizasyon) gerçekleştirilmiştir. Hücreler 37°C'de %5 karbondioksit içeren inkübatörde saklanmışlardır.

### 2.3.1. $\beta$ Arrestin 1 ve $\beta$ Arrestin 2 Proteinlerinin Susturulması ve Bunun Doğrulanması

$\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 proteinleri, hücreye özgü siRNA ve negatif kontrolleri ile üretici firmanın önerdiği uygun transfeksiyon protokolleri kullanılarak susturulmuştur ( $\beta$  arrestin *knockdown*) (Erickson ve ark., 2013 ve Shenoy ve ark., 2006). Hücreler altı kuyulu kültür plağına, her kuyuda  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde antibiyotik içermeyen besiyeri ile ekilmiştir. Firma tarafından sentezlenen  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 siRNA, transfeksiyon besiyeri içinde 70 nM konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bir başka tüpte de transfeksiyon reaktifi, transfeksiyon besiyeri içinde hazırlanmıştır. Bu iki çözelti karıştırılarak 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş, ardından hücrelere uygulanmıştır. Yirmi dört saatlik transfeksiyondan sonra taze besiyeri ile transfeksiyon ortamı değiştirilmiş; 72 saat sonunda hücreler 10  $\mu$ M karvedilol (Wisler ve ark., 2007) ile 1 saat ya da 1  $\mu$ M adrenalin (Du ve ark., 2010) ile 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanmış ve RIPA çözeltisi ile parçalanmıştır (lisis). BCA yöntemi ile protein miktar tayinleri yapılmış ve örnekler Western blot deneylerine hazır hale getirilmişlerdir.

GRK/ $\beta$ arr stimülasyonu ile başlayan sürecin sonuçlarından biri ERK fosforilasyonudur ve *biased* agonistlerin incelenmeleri sırasında belirteç olarak ERK fosforilasyonu sıklıkla kullanılmaktadır (Erickson ve ark., 2013 ve Wisler ve ark., 2007). Uygulanan yöntemin hedef proteinleri susturduğu ( $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2) ve bunun sonucu olarak ERK fosforilasyonunun azaldığının gösterilmesi için kontrol siRNA (*scrambled* siRNA),  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 siRNA uygulanmış hücrelerde;  $\beta$ arr1,  $\beta$ arr2 ve ERK'e özgü antikorlar kullanılarak Western blot yapılmıştır. Bir *biased* agonist olduğu kabul edilen karvedilol hücre içinde uyardığı sinyalleri G-proteini aracılığı ile yapmadığı için  $\beta$  ve  $\alpha$  reseptörlerin hücre içindeki ikincil ulakları olan, sırasıyla cAMP (siklik adenosin monofosfat) ve IP3 (inozitol 3-fosfat) oluşumuna etki etmesi beklenmemektedir. Bunun gösterilmesi için kontrol ve susturulmuş hücrelerde



karvedilol uygulamasından sonra cAMP ve IP3 miktarı ölçülmüştür. Bu ölçümler antijen-antikor etkileşmesi esasına dayanan kitler [ELISA (İmmünoenzimatik Yöntem)] yardımıyla spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol amacıyla bu incelemeler adrenalın varlığında da yapılmıştır.

### **2.3.2. Karvedilol ve $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Substrat Metabolizmasına Etkisinin Değerlendirilmesi**

Karvedilol ve  $\beta$ arr proteinlerinin glukoz kullanımına katkılarının değerlendirilmesi için glikoliz hızına etki eden glukoz taşıyıcılarından biri olan GLUT1 miktarları Western blot yöntemiyle belirlenmiştir. GLUT1 tüm memeli hücrelere bazal glukoz taşınmasında görevlidir (TeSlaa ve Teitell, 2014).

$\beta$ arr1'in PPAR $\gamma$  ile etkileşerek gen transkripsiyonunu etkilediği gösterilmiştir. PPAR $\gamma$ 'nın hedef genlerinden olan ve endotel hücreler ve kardiyomiyositlerde hücre içine yağ asidi taşınmasında görevli CD36 proteininin mRNA düzeyleri  $\beta$ arr1 genleri silinmiş adipozit hücrelerde artmış,  $\beta$ arr1-tg hücrelerde ise azalmıştır (Zhuang ve ark., 2011a). PPAR $\gamma$  gibi PPAR $\alpha$  da metabolik homeostaza önemli katkı sağlamaktadır ve oksidasyon kapasitesi yüksek karaciğer, kahverengi adipoz doku, iskelet kası ve kalp gibi dokularda ekspresyonu yüksektir (Braissant ve ark., 1996). Mitokondriye yağ asidi transferini düzenleyen CPT1 ve 2, ayrıca yağ asitlerinin mitokondride gerçekleşen  $\beta$ -oksidasyon reaksiyonlarında görevli enzimler (açıl KoA dehidrojenazlar gibi) PPAR $\alpha$  tarafından transkripsiyonel olarak kontrol edilmektedir (Rakhshandehroo ve ark., 2010). Bu nedenle, karvedilolün metabolik etkilerini ve buna  $\beta$ arr proteinlerinin katkısını değerlendirmek için PPAR $\alpha$  ekspresyonu protein düzeyinde incelenmiştir. Bu incelemeler, hem kontrol hem de  $\beta$ arr susturulmuş

hücrelerde gerçekleştirilmiştir. PPAR $\alpha$  ve CD36 miktarı Western blot yöntemiyle ölçülmüştür.

### **2.3.3. Karvedilol ve $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Mitokondriyal Biyojeneze Etkisinin Değerlendirilmesi**

Karvedilol tedavisinin mitokondriyal biyojeneze etkisinin ve varsa bu etkilere  $\beta$ arr proteinlerinin aracılık edip etmediklerinin değerlendirilmesi için kontrol ve  $\beta$ arr susturulmuş hücrelerde PGC-1 $\alpha$  ve TFAM protein miktarı Western blot yöntemiyle incelenmiştir.

## **2.4. Western Blot**

Sıvı nitrojen ile dondurulan ve -80°C'de saklanan dokular, sıvı nitrojen içinde (-196°C) toz edilmiş ve içinde RIPA çözeltisi, fosfataz inhibitörü sodyum ortovanadat (Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 200 nM) ve proteaz inhibitör kokteyli (1:100) bulunan tüplere alınmıştır. Ultrasonik homojenizatör kullanılarak dokular homojenize edilmiş ve +4°C'de 2 saat boyunca çalkalanmıştır. +4°C'de 16 000xg'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrılmış ve sonraki analizler için -80°C'de saklanmıştır. C2C12 hücreler homojenize edilirken, kuyulardan kazıyıcı (*cell scraper*) yardımı ile kaldırılmış, pipetaj yapılarak parçalanmaları ve homojenizasyonları sağlanmıştır. Bundan sonra +4°C'de 16 000xg'de 30 dk'lık santrifüj uygulanmış, süpernatant

ayrılmıştır. Bu lizatlarının protein miktar tayinleri kolorimetrik esasa dayanan BCA yöntemi ile yapılmıştır.

Örnek lizatları ve denatürasyon çözeltisinin (*Laemmlı Sample Buffer*) karışımı, jele yüklenecek her örnekte eşit miktarda protein olacak şekilde hazırlanmıştır. Denatürasyonun gerçekleşmesi için örnekler 37°C’de 30 dk bekletilmiştir.

SDS-Jel elektroforezi için örnekler incelenecek proteinin molekül ağırlığına uygun olarak %8, %10 ya da %12,5 konsantrasyonlarda hazırlanmış poliakrilamid jele yüklenmiştir. Elektroforezde kullanılan jeller örneklerin yüklendiği yükleme jeli ve örneklerin molekül ağırlıklarına göre ayrıldığı ayırıcı jel olmak üzere iki aşamada hazırlanmıştır. Jel formülasyonları Çizelge 2.5 (Ayırıcı jel) ve Çizelge 2.6 (Yükleme jeli)’da gösterilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Ayırıcı Jel Formülasyonu

	Ayırıcı jel; 1,5 mm;2 jel için		
	%8 (ml)	%10 (ml)	%12,5 (ml)
Bidistile su	10,20	8,74	6,86
Gliserol	0,56	0,56	0,56
Tris/SDS (1,5 M, pH 8,8)	5,63	5,63	5,63
Akrilamid/bisakrilamid (%30:%0,8)	6,00	7,50	9,38
APS (%10)	0,11	0,11	0,11
TEMED	0,01	0,01	0,01

**Çizelge 2.6.** Yükleme Jel Formülasyonu

	Yükleme jeli; %4-5; 1,5 mm;2 jel için
	(ml)
Bidistile su	5,895
Tris/SDS (1.5 M, pH 6.8)	2,34750
Akrilamid/bisakrilamid (%30:%0,8)	1,03125
APS (%10)	0,09375
TEMED	0,00938

Elektroforez ile örnekler jel üzerinde molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılmış ve sonrasında antikorla muamele edilmeye elverişli PVDF ya da nitroselüloz membranlara uygun voltajda elektrik akımı ile transfer edilmiştir. Transfer sırasında kullanılan tampon çözelti (1000 ml için, 100 ml TG (10x); 200 ml metanol; 700 ml bisidtile su) her deney için taze hazırlanmıştır.

Membranlar spesifik olmayan antikor bağlanmalarını en aza indirmek için %3-5 BSA tampon çözeltisi ile oda sıcaklığında bir saat çalkalanmış (bloklama işlemi) ve sonrasında yıkanmıştır (TBS-T; %1 Tween20 içeren 1X TBS çözeltisi). Membranlar, %5 BSA tampon çözeltisinde 1/1000 ya da 1/2000 konsantrasyonda hazırlanmış olan birincil (*primary*) antikorla gece boyunca, +4°C'de çalkalanmıştır. İnkübasyon ve rutin yıkama işlemleri (TBS-T çözeltisi ile üç kere 10'ar dk) sonrasında bu kez birincil antikora uygun ikincil (*secondary*) antikorla +4°C'de bir saat inkübe edilmiştir. Yıkanan membranlar ECL reaktif karışımı ile 1-2 dk muamele edilmiş ve kaset içinde karanlık odada röntgen filmine basılmıştır. Pozlama, incelenecek olan proteine göre 1 sn-30 dk arasında değişkenlik göstermiştir. Filmde görüntünün oluşmasından sonra (*developer/fixer* muamelesi) filmler yıkanmış, kurutulan filmdeki görüntüler taranarak Image J® programı yardımıyla bilgisayarda analiz edilmiştir.

## 2.5. İstatistiksel Analizler

Veriler ortalama  $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Grafiklerin oluşturulması ve istatistiksel analizler GraphPad Prism5 programı kullanılarak yapılmıştır. Hemodinamik parametreler ve Western blot çalışmalarındaki çoklu kıyaslarda tek-yönlü ANOVA,  $\beta$ arr susturma işlemi sonrasında yapılan Western blot çalışmalarındaki çoklu kıyaslarda iki-yönlü ANOVA kullanılmıştır. ANOVA testi sonrasında post-hoc Bonferroni ya da Dunnett analizi yapılmıştır. Anlamlılık düzeyleri (p) aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$

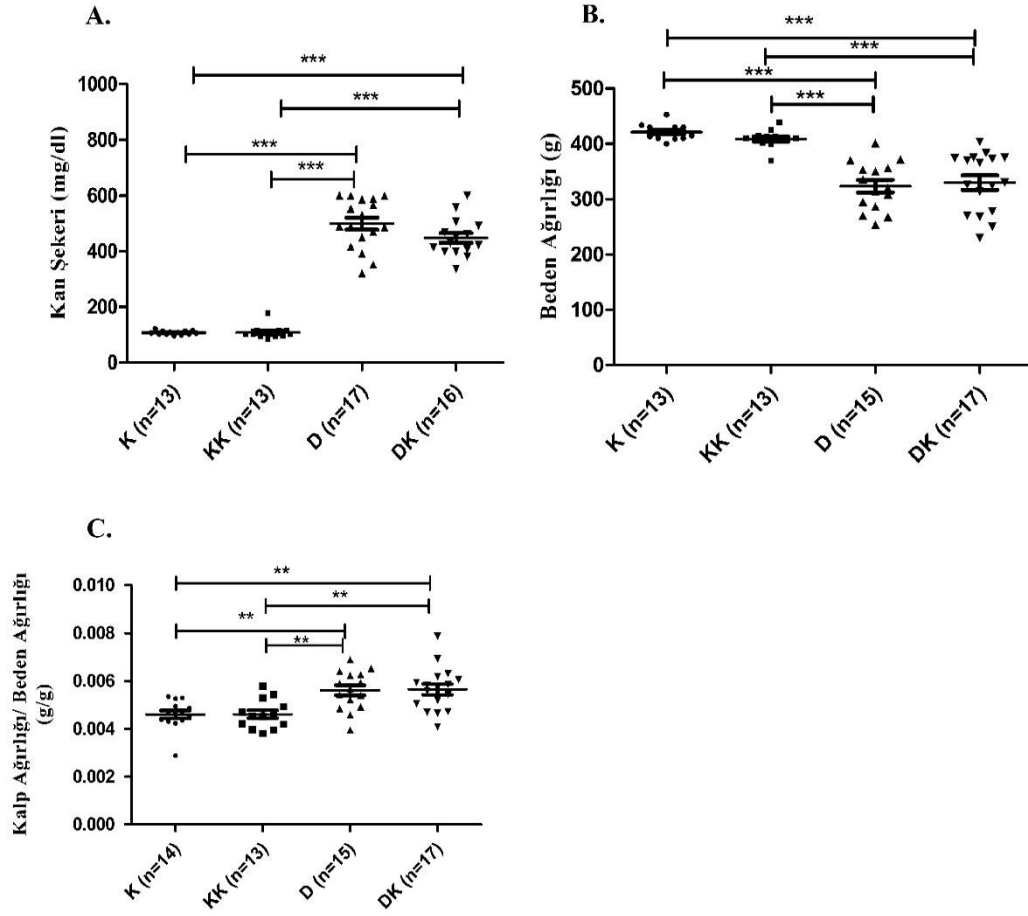
## 2.6. Yazım ve Grafiklerin Oluşturulması

Bu tez çalışmasının yazımında Microsoft Office Word programı kullanılmıştır. Kaynakçanın düzenlenmesinde End Note (Sürüm 8), grafiklerin çiziminde GraphPad Prism5 programı kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Sıçanların Genel Özellikleri

Şekil 3.1’de STZ-diyabetin ve karvedilol tedavisinin sıçanların genel özellikleri üzerine etkisinin ölüm anındaki değerlendirilmesi gösterilmektedir. Diyabetik hayvanların kan şekerleri diyabetik olmayanlara kontrolle kıyasla anlamlı olarak yüksektir (Şekil 3.1A). Beden ağırlığı ortalaması yaklaşık olarak eşit olacak şekilde oluşturulan deney gruplarının 12 haftalık deney protokolü sonrasında ölüm anlarında beden ağırlıkları ölçülmüştür. Diyabetik hayvanlar kontrol grubuna kıyasla kilo kaybetmiştir ve karvedilol tedavisinin beden ağırlığı üzerine etkisi olmamıştır (Şekil 3.1B). Kardiyak hipertrofinin bir göstergesi olarak kalp ağırlığının beden ağırlığına oranı gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Beklendiği gibi diyabetik sıçanlarda bu oran kontrole göre daha yüksek bulunmuş, ne var ki karvedilol tedavisinin bu oran üzerinde iyileştirici etkisi olmamıştır (Şekil 3.1C).



**Şekil 3.1.** Sıçanların Genel Özellikleri

Deney gruplarının ölüm anında belirlenen kan şekerleri (A); beden ağırlıkları (B); kalp ağırlığı/beden ağırlığı oranları (C). Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

### 3.2. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Üzerine Etkisi

Çizelge 3.1 sıçanların karvedilol tedavisinin birinci ve üçüncü haftasındaki kan basıncı ve kalp atım hızı değerlerini göstermektedir. Karvedilol tedavisinin etkisi üçüncü haftada belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Karvedilol tedavisi uygulanan

kontrol sıçanlarda sistolik kan basıncı, ortalama arter basıncı ve kalp atım hızı anlamlı olarak azalmıştır. Diyabetik sıçanlarda ise karvedilol tedavisi yalnızca kalp atım hızında anlamlı bir düşüğe neden olmuştur.

**Çizelge 3.1.** Sıçanların Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Parametreleri.

	Tedavinin Birinci Haftası				Tedavinin Üçüncü Haftası			
	K	KK	D	DK	K	KK	D	DK
<b>Sistolik Kan Basıncı</b>	163,6± 4,5 n=6	164,7± 5,0 n=6	155,2± 11,0 n=8	143,3± 4,6 n=6	167,8± 3,8 n=11	142,3± 3,1*** n=11	155,1± 4,4 n=15	145,5± 3,1** n=13
<b>Diyastolik Kan Basıncı</b>	145,8± 3,1 n=6	143,0± 5,2 n=6	109,3± 10,3** n=6	123,2± 5,1 n=5	142,8± 3,7 n=10	138,6± 4,0 n=10	116,9± 2,8*** n=11	120± 4,2*** n=12
<b>Ortalama Arter Basıncı</b>	133,3± 4,8 n=5	138,1± 10,6 n=8	153,9± 5,0 n=6	154,7± 3,6 n=6	160,5± 4,4 n=12	135,9± 5,2* n=11	142,0± 4,8*** n=16	138,4± 4,8* n=15
<b>Kalp Atışı</b>	352,6± 17,5 n=6	333,5± 9,6 n=5	265,4±11 ,5 n=6	265,4± 11,5** n=6	379,2± 6,486 n=11	334,7± 6,7*** n=10	306,7± 7,3*** n=12	275,9± 6,8***# n=12

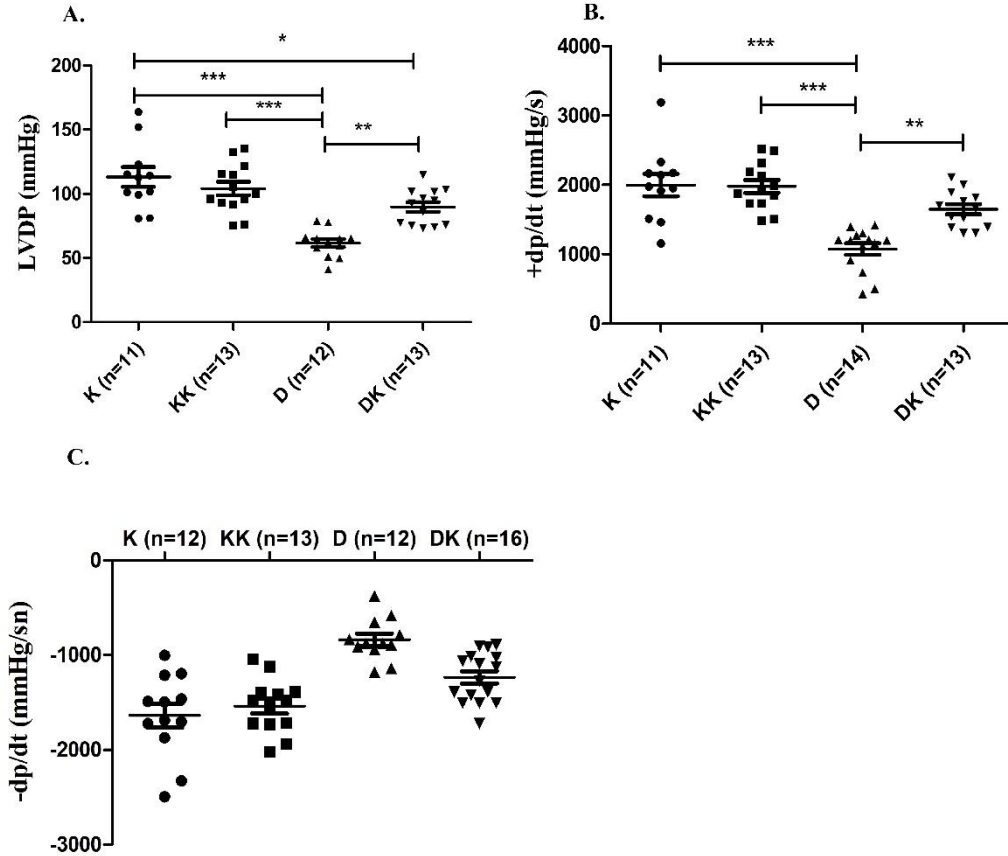
\*, \*\*, \*\*\* kontrole göre anlamlılık; # diyabete göre anlamlılık. Her gruptaki örnek sayısı ölçülen değer yanında belirtilmiştir

### 3.3. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin Bazal Kardiyak Parametreler Üzerine Etkileri

Hemodinamik parametrelerin ve miyokard fonksiyonunun değerlendirilmesi için Langendorff perfüzyon modeli kullanılarak bazal değerler (Şekil 3.2) ve kalplerin artan dozlarda izoproterenole verdiği yanıtlar (Şekil 3.3) ölçülmüştür.



Bazal değerler, kalpler Langendorff sistemine asılıp 20 dk perfüze edildikten sonra kaydedilmiştir. Bazal değerler incelendiğinde LVDP (Şekil 3.2A) ve  $+dp/dt$  (Şekil 3.2B) değerlerindeki düşüş ile  $-dp/dt$  (Şekil 3.2C) değerindeki artış diyabetin sol ventrikül fonksiyonunu bozduğunu göstermektedir. Diyabetik hayvanlarda karvedilol tedavisi  $\pm dp/dt$  değerlerini anlamlı olarak iyileştirmiştir.

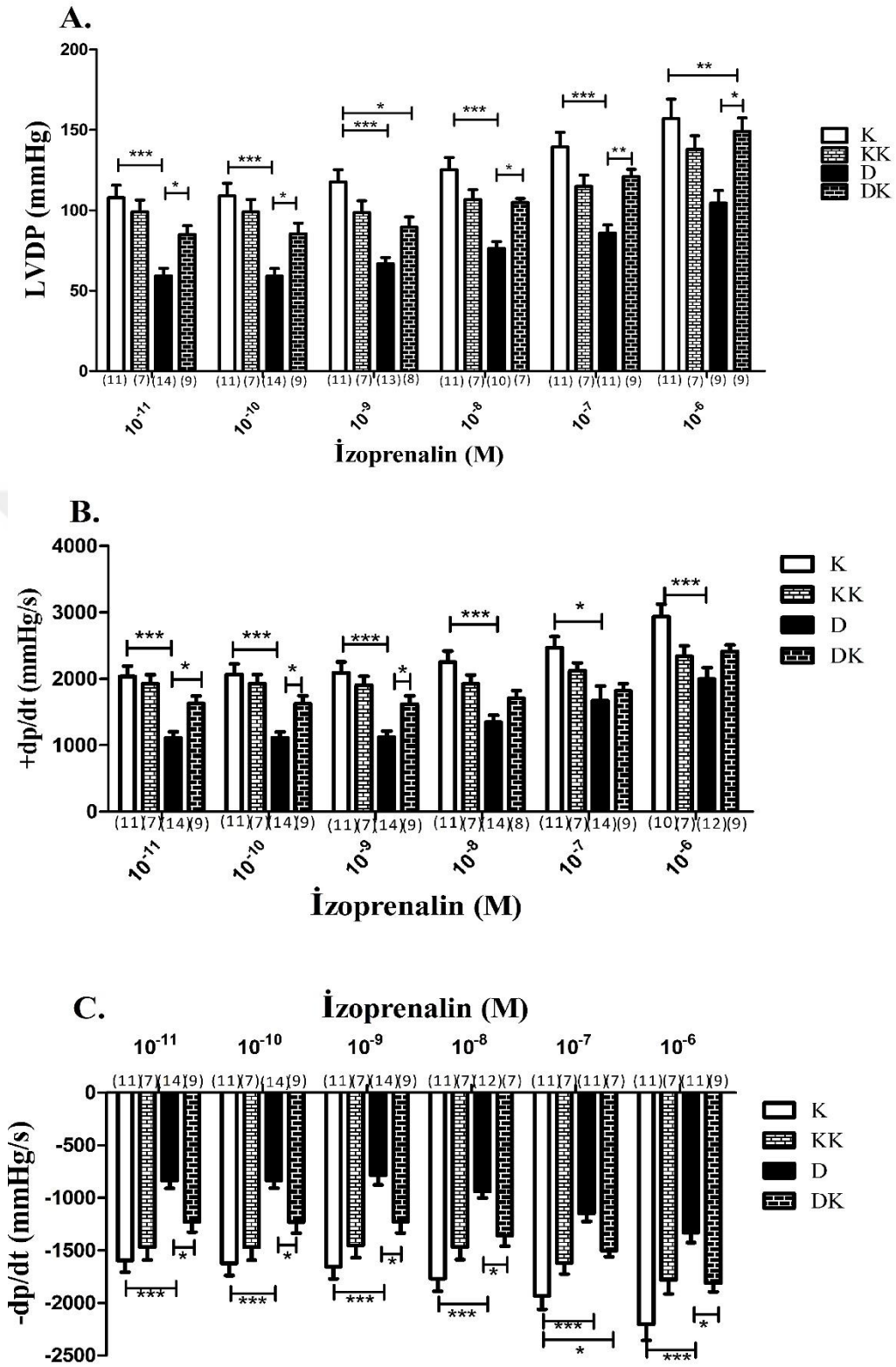


**Şekil 3.2.** Bazal Kalp Parametreleri.

Langendorff perfüzyon modeli ile ölçülmüş olan LVDP (A);  $dp/dt$  (B) ve  $-dp/dt$  (C) değerleri gösterilmektedir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

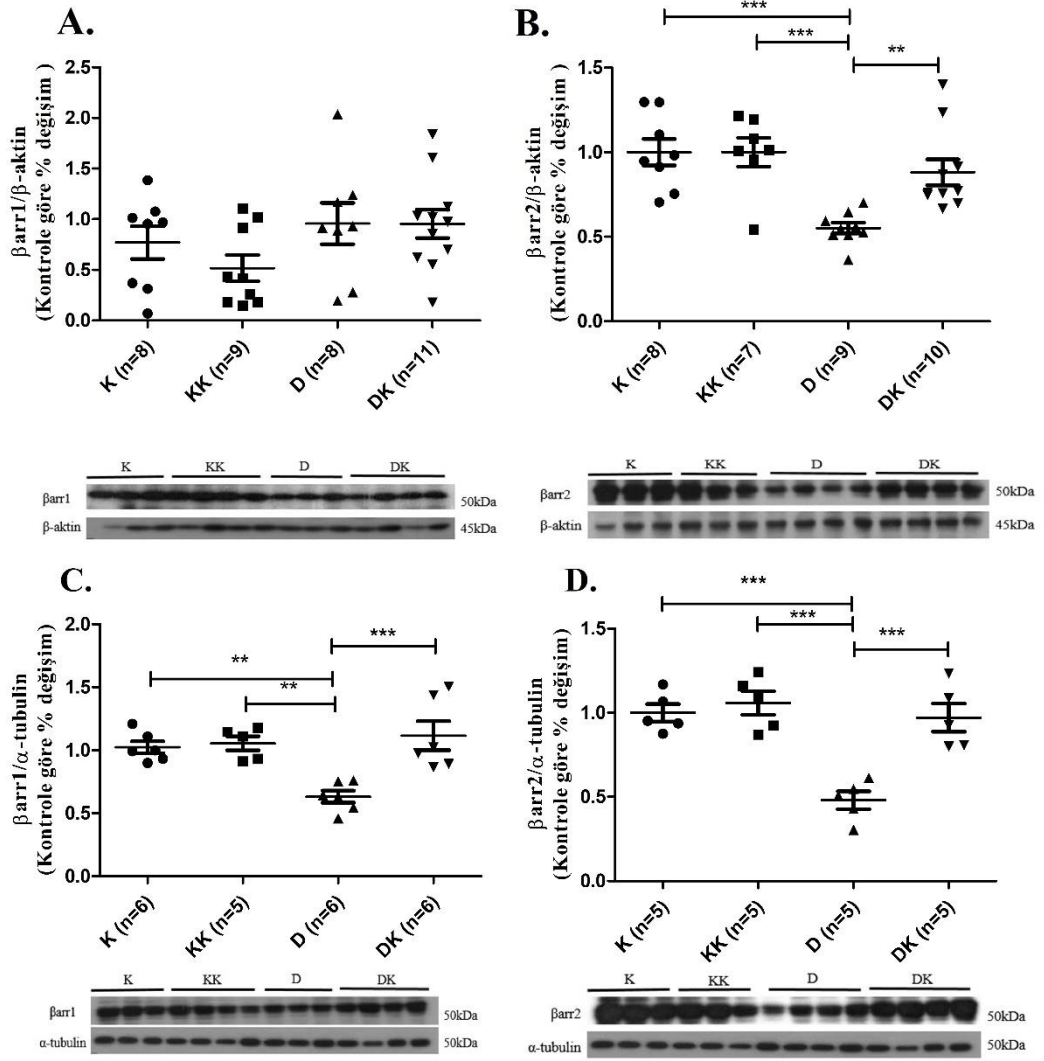
### 3.4. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin İzoproterenol Yanıtlarına Etkisi

Bazal değerlerin kaydedilmesinden sonra kalplerin artan dozlarda ( $10^{-11}$ - $10^{-5}$ M) izoproterenole verdikleri yanıtları değerlendirmek için LVDP (Şekil 3.3A),  $+dp/dt$  (Şekil 3.3B) ve  $-dp/dt$  (Şekil 3.3C) parametreleri incelenmiştir. İzoprenalinin hemen hemen tüm konsantrasyonlarında karvedilol tedavili diyabetik sıçanlarda LVDP ve  $+dp/dt$  değeri tedavi edilmemiş diyabetik sıçanlara göre yüksek;  $-dp/dt$  değeri ise düşük bulunmuştur. Benzer şekilde izoproterenolün neredeyse hiçbir dozunda LVDP ve  $\pm dp/dt$  değerleri kontrol sıçanlar ve karvedilol tedavili diyabetik sıçanlar arasında farklı bulunmamıştır. İzoprenalinin  $10^{-5}$  M dozunda gruplar arasında farklılık oluşmadığı için grafiklere yansıtılmamıştır. Karvedilol ile tedavi edilmiş diyabetik sıçan kalplerinin LVDP değerleri bazı dozlarda ( $10^{-9}$  M ve  $10^{-6}$  M) kontrolden düşük;  $-dp/dt$  değeri ise  $10^{-7}$  M dozda kontrolden yüksektir.



### 3.5. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin $\beta$ Arrestin Proteinleri Üzerine Etkisi

STZ-diyabetin ve karvedilol tedavisinin sol ventrikülde ve iskelet kasında  $\beta$ arr proteinleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi için Western blot yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.4).  $\beta$ arr1 miktarı, sol ventrikülde diyabet ya da karvedilol tedavisinden etkilenmezken (Şekil 3.4A); iskelet kasında diyabet ile miktarı azalmış, karvedilol tedavisi ile bu azalma geri çevrilmiştir (Şekil 3.4C).  $\beta$ arr2 miktarı ise hem sol ventrikülde (Şekil 3.4B) hem de iskelet kasında (Şekil 3.4D) diyabetten etkilenerek azalmış, karvedilol ile bu azalma engellenmiştir.

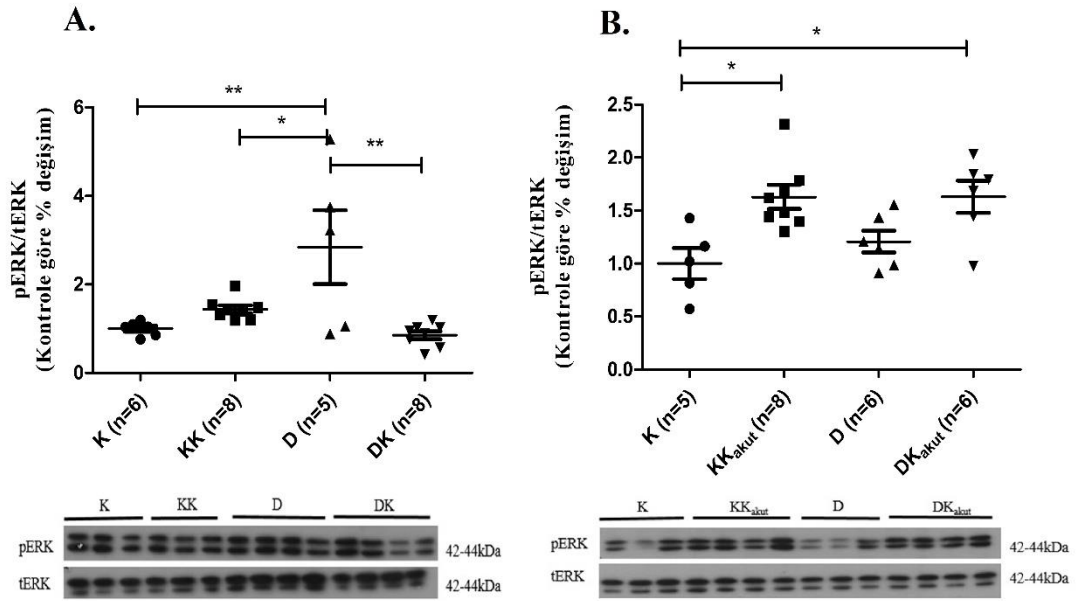


**Şekil 3.4.**  $\beta$  arrestin 1 ve  $\beta$  arrestin 2 Protein Miktarı.

Sol ventrikülde  $\beta$ arr1(A) ve  $\beta$ arr2 (B); iskelet kasında  $\beta$ arr1(C) ve  $\beta$ arr2 (D) ekspresyonları ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmektedir. Veriler  $\beta$ -Aktin ya da  $\alpha$ -tubulin ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

### 3.6. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin ERK Aktivasyonu Üzerine Etkisi

Karvedilolün  $\beta$ arr proteinleri aracılığı ile ERK fosforilasyonunu tetiklediği bilinmektedir (Wisler ve ark., 2007). Karvedilol ve  $\beta$ arr-aracılı etkilerin değerlendirilmesi için sol ventrikülde ERK fosforilasyonu incelenmiştir (Şekil 3.5A). Ayrıca, kontrol ve diyabetik kalplerin bir kısmına Langendorff düzeneğinde akut olarak  $10^{-5}$ M karvedilol uygulanmış ve bu kalplerde de ERK fosforilasyonu değerlendirilmiştir (Şekil 3.5B). Diyabetin ERK fosforilasyonunu anlamlı bir şekilde artırdığı bulunmuş, karvedilol tedavisinin bu artışı ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, akut olarak uygulanan karvedilol –kronik tedavinin aksine- ERK fosforilasyonunda artışa neden olmuştur.



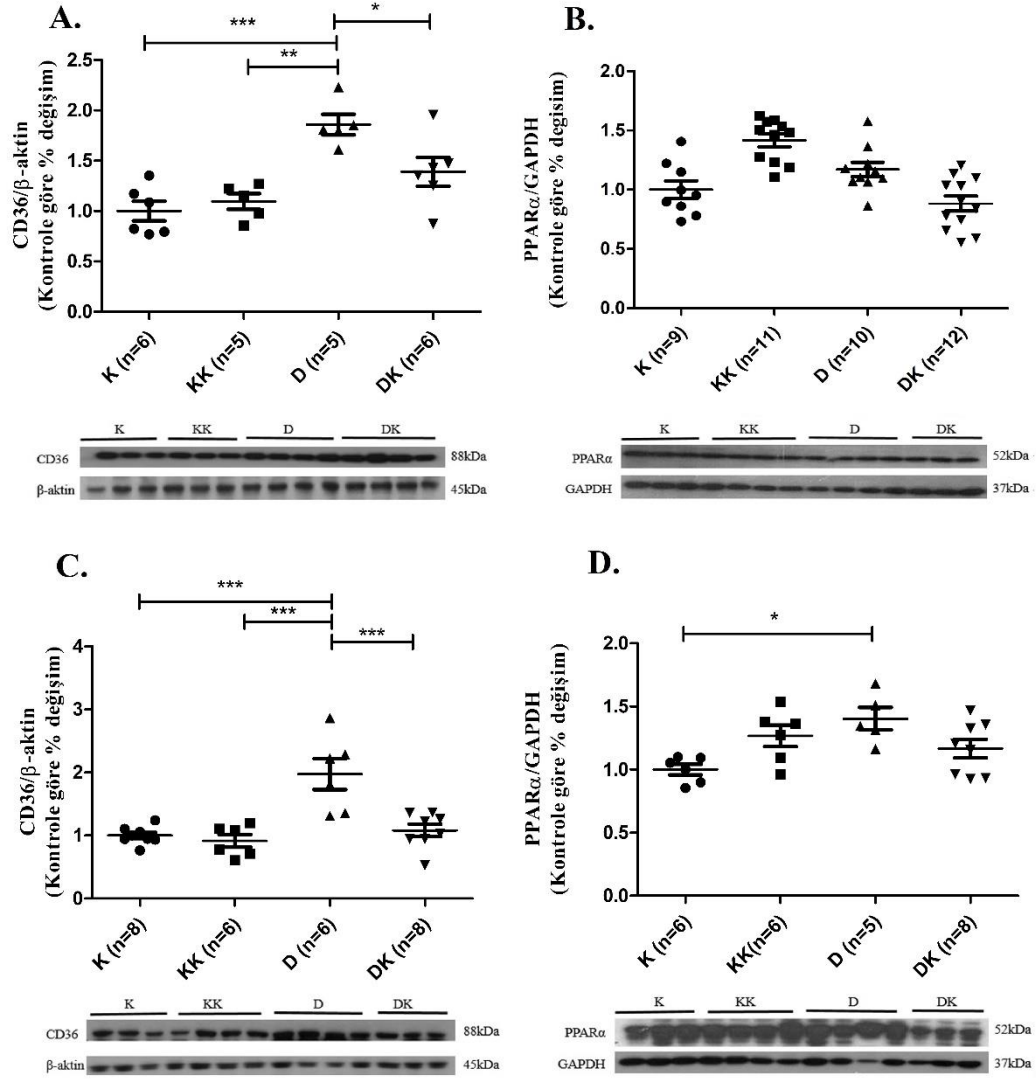
**Şekil 3.5.** Sol Ventrikülde ERK Fosforilasyonu.

Karvedilol tedavisinin (A) ve akut karvedilol uygulamasının (B) ERK fosforilasyonu üzerine olan etkisi ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmektedir. Fosforile ERK değerleri total-ERK değerleri ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir. (KK<sub>akut</sub>: Langendorff sisteminde akut olarak karvedilol uygulanmış kontrol kalpler; DK<sub>akut</sub>: Langendorff sisteminde akut olarak karvedilol uygulanmış diyabetik kalpler)

### 3.7. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin Yağ Asidi Kullanımı Üzerine Etkisi

Yağ asidi metabolizması göstergelerinden biri olan CD36 protein miktarı sol ventrikülde (Şekil 3.6A) ve iskelet kasında (Şekil 3.6C) değerlendirilmiştir. Diyabet, CD36 miktarını her iki dokuda da artırmıştır. Karvedilol tedavisi ise CD36 protein düzeyinin kontrol seviyesine inmesini sağlamıştır.

Yağ asidi metabolizmasının bir diğer göstergesi olarak PPAR $\alpha$  proteini de değerlendirilmiştir. İskelet kasında diyabet, PPAR $\alpha$  miktarını artırmıştır ve bu artış karvedilol tedavisi ile önlenmiştir (Şekil 3.6D). Sol ventrikülde PPAR $\alpha$  gruplar arasında farklılık göstermemiştir (Şekil 3.6B).



**Şekil 3.6.** Yağ Asidi Metabolizmasında Görev Alan Proteinler.

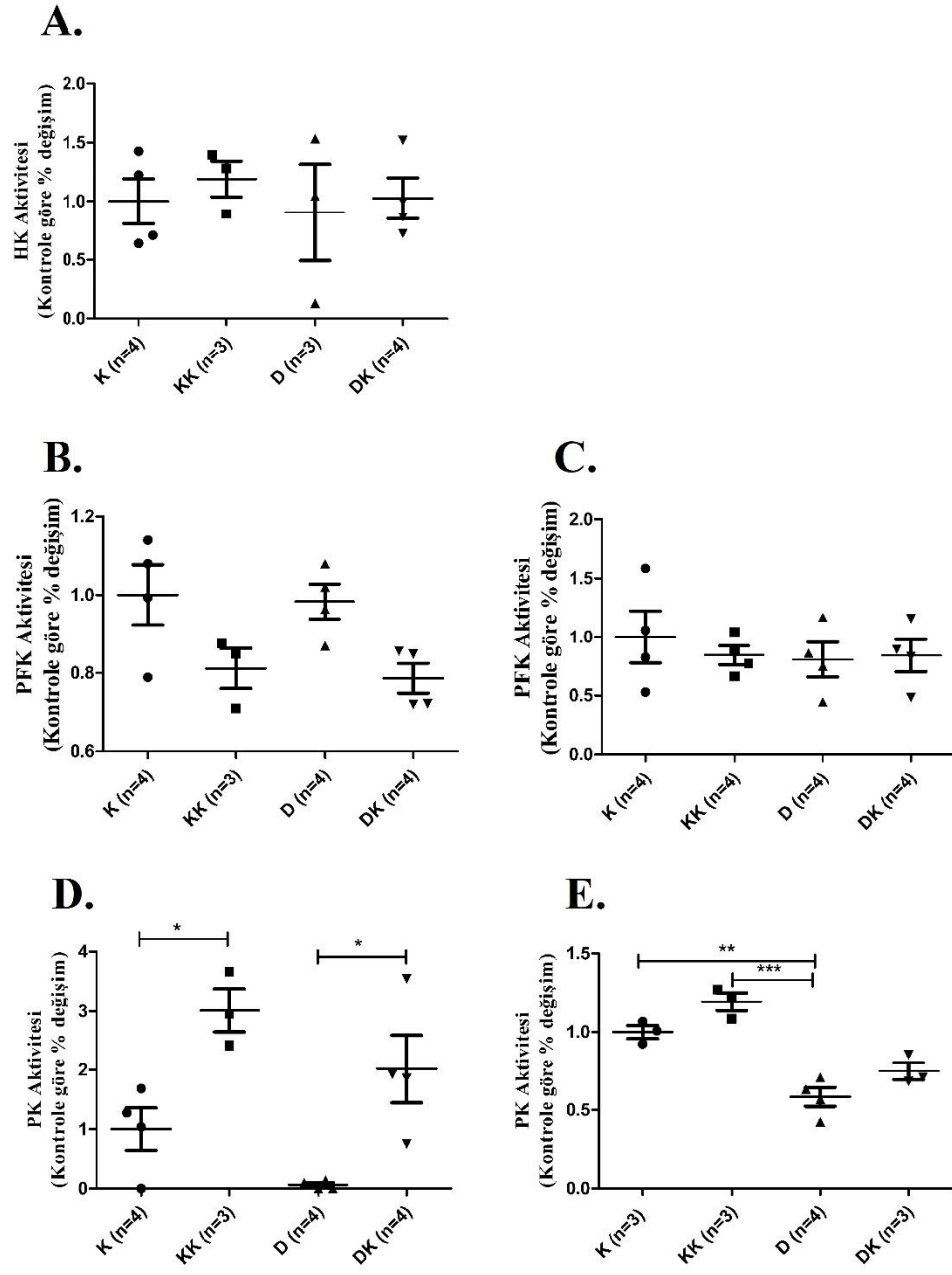
Sol ventrikülde CD36 (A) ve PPAR $\alpha$  (B) ekspresyonları; iskelet kasında CD36 (C) ve PPAR $\alpha$  (D) ekspresyonları ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmektedir. Veriler  $\beta$ -aktin ya da GAPDH ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.



### 3.8. STZ-Diyabet ve Karvedilol Tedavisinin Glukoz Kullanımı Üzerine Etkisi

#### 3.8.1. Glikoliz Enzimlerinin Aktivitesi

Glukoz kullanımının değerlendirilmesi için sol ventrikülde ve iskelet kasında karbohidrat metabolizmasında önemli rolü olan bazı enzimlerin aktiviteleri incelenmiştir. HK (Şekil 3.7A) ve PFK (Şekil 3.7B ve Şekil 3.7C) aktiviteleri gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Karvedilol tedavisi uygulanan kontrol ve diyabetik hayvanlarda kendi kontrol gruplarına kıyasla PK aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Şekil 3.7D). İskelet kasında karvedilol tedavisi ile PK aktivitesi artmış gibi gözükse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 3.7E).

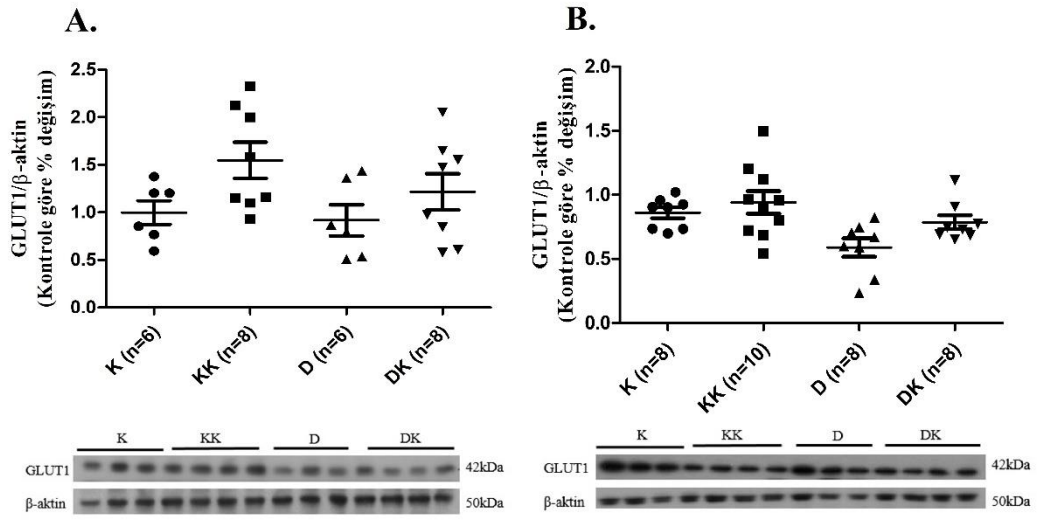


**Şekil 3.7.** Glikoliz Enzimlerinin Aktiviteleri.

Sol ventrikülde HK aktivitesi (A); Sol ventrikül (B) ve iskelet kasında (C) PFK aktivitesi; sol ventrikül (D) ve iskelet kasında (E) PK aktivitesi gösterilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

### 3.8.2. Glukoz Taşıyıcı Proteinlerin Seviyeleri

Hücre içine glukoz alınmasından sorumlu olan taşıyıcılardan biri olan GLUT1 miktarı sol ventrikül dokusunda (Şekil 3.8A) ve iskelet kasında (Şekil 3.8B) değerlendirilmiş ancak gruplar arasında farklılık bulunamamıştır.

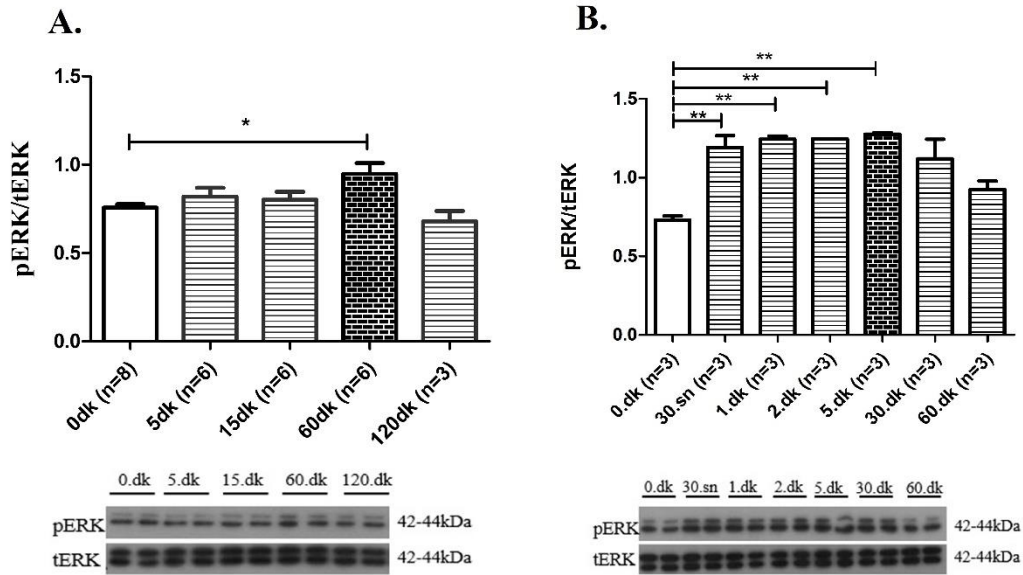


**Şekil 3.8.** Glukoz Taşıyıcı Proteinler.

Sol ventrikül dokusunda (A) ve iskelet kasında (B) GLUT1 miktarları ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmektedir. Veriler β-aktin ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

### 3.9. C2C12 Hücrelerinde Karvedilol ve Adrenalinin ERK Aktivasyonu Üzerindeki Etkileri

ERK fosforilasyonu hem G-proteinleri hem de  $\beta$ arr proteinleri aracılığı ile gerçekleşebilmektedir (Luo ve ark., 2008). Karvedilol bir  $\beta$ arr *biased* agonist olarak ERK fosforilasyonunu  $\beta$ arr proteinleri aracılığı ile uyarırken, adrenalin bu uyarıyı G-proteinleri aracılığı ile yapmaktadır. Karvedilol ve adrenalin ile ERK fosforilasyonunun kaçınıcı dakikada maksimum değere ulaştığının belirlenmesi için bu ligandlar hücrelere farklı sürelerde uygulanmıştır. Karvedilol uygulamasını takiben belirli aralıklarla toplanan lizatlarda değerlendirilen ERK fosforilasyonu 60. dk'da en yüksek değerine ulaşmıştır (Şekil 3.9A). Benzer uygulama adrenalin için de yapılmış ve en yüksek değer 5. dk'da gözlenmiştir (Şekil 3.9B). Bu nedenle diğer işlemler için karvedilol ile 60 dk, adrenalin ile 5 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.9.** ERK Aktivasyonunun Zamana Bağlı Olarak Değişimi.

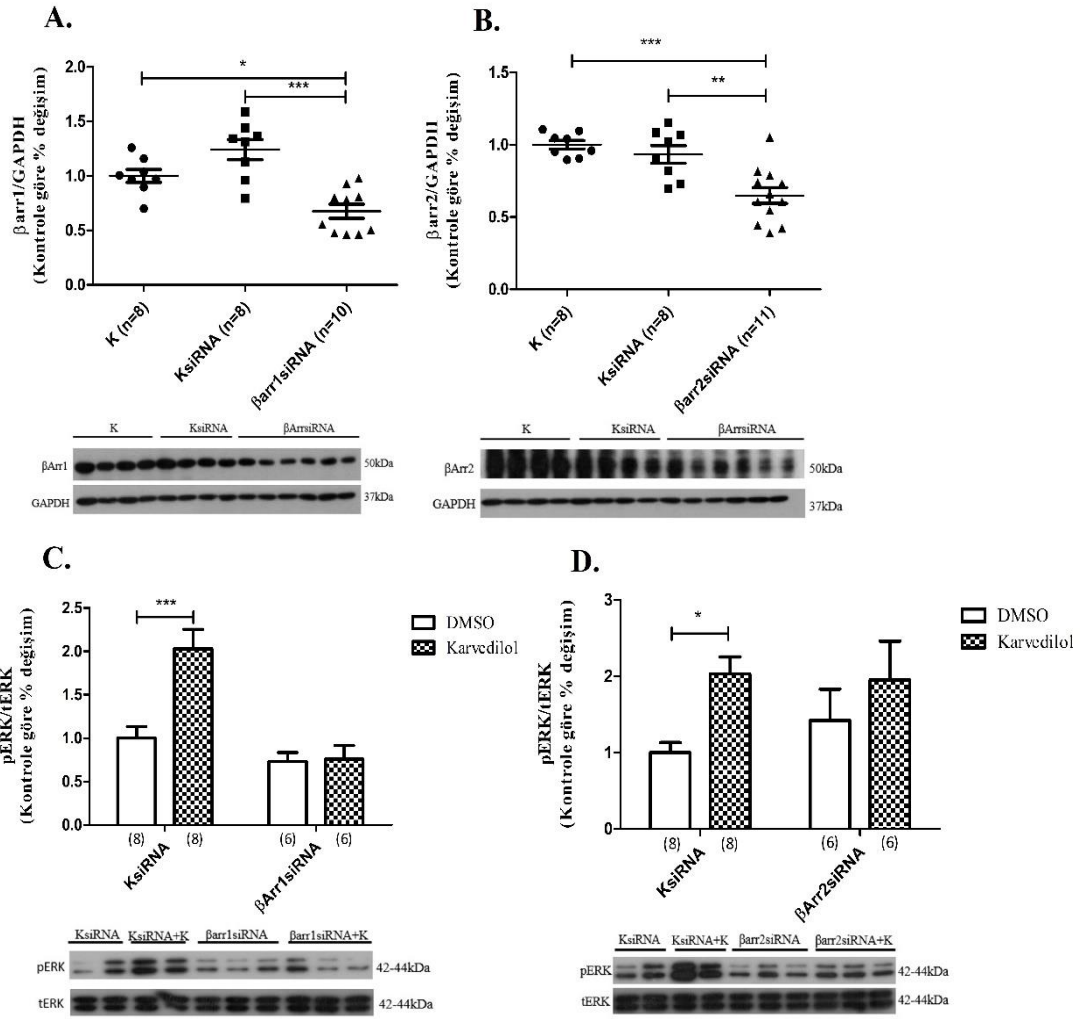
Karvedilol (A) ve adrenalin (B) ile inkübasyon sonrasında ERK aktivasyonu ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmektedir. Veriler tERK ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

### 3.10. C2C12 Hücrelerinde $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Susturulmasının Doğrulanması

Üretici firma tarafından sentezlenen  $\beta$ arr proteinlerine özgü siRNA ( $\beta$ arr1siRNA ve  $\beta$ arr2siRNA) ve negatif kontrol siRNA (KsiRNA) uygulanan hücrelerde  $\beta$ arr proteinlerinin susturulmasının doğrulanması için Western blot yöntemi kullanılmıştır. Beklendiği gibi siRNA uygulamasından sonra  $\beta$ arr1 (Şekil 3.10A) ve  $\beta$ arr2 (Şekil 3.10B) proteinlerinin miktarı kontrol hücelere ve KsiRNA uygulanmış hücelere göre anlamlı şekilde azalmıştır.

Hiçbir işlem uygulanmamış hücreler ile KsiRNA uygulanmış hücreler arasında  $\beta$ arr proteinleri açısından bir fark bulunmadığından, bundan sonraki işlemlerde hiç işlem yapılmamış hücreler kullanılmamıştır.

Kontrol hücrelerde karvedilol uygulaması ERK fosforilasyonunda anlamlı bir artışa neden olurken;  $\beta$ arr1 (Şekil 3.10C) ve  $\beta$ arr2 (Şekil 3.10D) proteinlerinin susturulduğu hücrelerde fosforilasyon gerçekleşmemiştir.

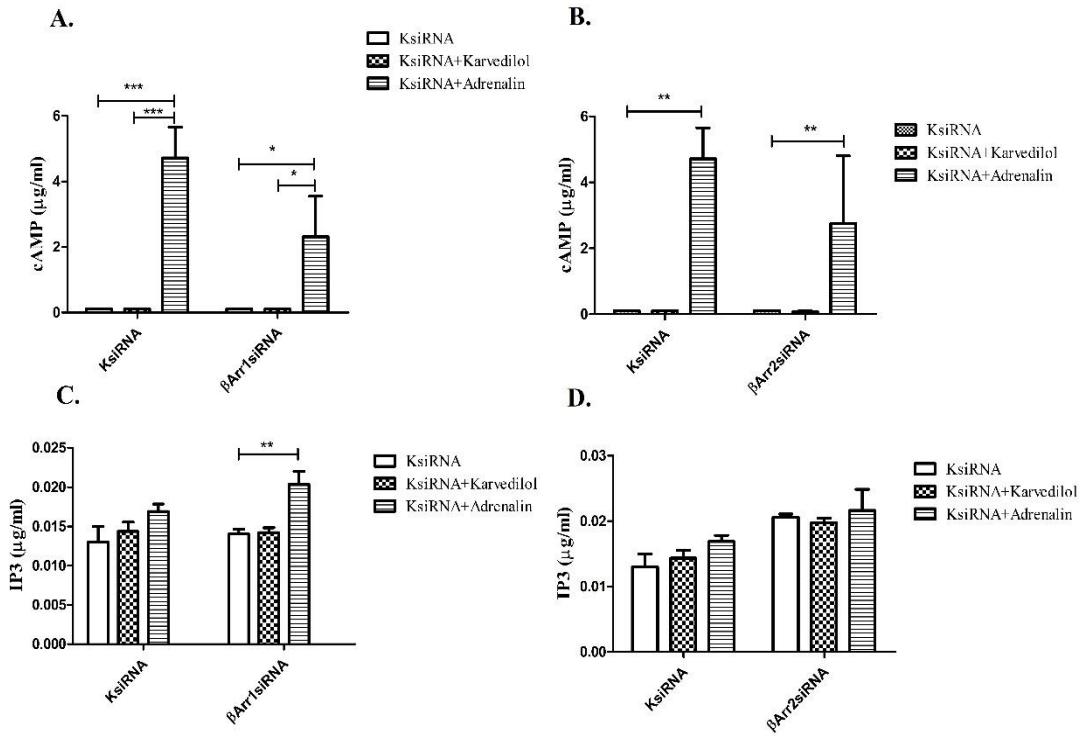


**Şekil 3.10.**  $\beta$  arrestin Proteinlerinin Susturulması.

İşlem yapılmamış hücreler, KsiRNA uygulanmış hücreler ve  $\beta$ arr1 (A) ve  $\beta$ arr2 (B) siRNA uygulanmış hücrelerde sırasıyla  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 protein miktarı; KsiRNA uygulanmış hücreler ve  $\beta$ arr1 (C) ve  $\beta$ arr2 (D) siRNA uygulanmış hücrelerde fosforile ERK protein miktarı ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmiştir. Veriler GAPDH ya da tERK ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı parantez içinde belirtilmiştir. (K: Kontrol; KsiRNA: Negatif kontrol siRNA uygulanmış hücreler;  $\beta$ arr1siRNA:  $\beta$ arr1 proteini susturulmuş hücreler;  $\beta$ arr2siRNA:  $\beta$ arr2 proteini susturulmuş hücreler)

### 3.11. C2C12 Hücrelerinde Karvedilol ve Adrenalinin G-proteini Aracılı İkincil Ulaklar Üzerine Etkileri

Selektif  $\alpha_1$ -AR ve selektif olmayan  $\beta$ -AR blokörü olan karvedilolün,  $G_s$  proteininin ikincil ulağı cAMP'ı ya da  $G_q$  proteininin ikincil ulağı IP3'ü uyarmaması beklenmektedir. Karvedilolün agonist-benzeri etkilerinin G-proteinleri aracılığı ile olmadığını gösterilmesi için, ikincil ulaklar üzerine etkileri pozitif kontrol adrenalin ile kıyaslanmıştır. Beklendiği gibi karvedilol cAMP miktarlarını, adrenalin gibi uyarmamıştır (Şekil 3.11A ve Şekil 3.11B). Örnek sayısının az olmasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı değilse de adrenalin uygulanan hücrelerde IP3 seviyelerinin görece yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.11C ve Şekil 3.11D).



**Şekil 3.11.** Karvedilol ve Adrenalin Uygulamasından Sonra cAMP ve IP3 Miktarları. Kontrol siRNA uygulanmış hücrelerde ve  $\beta$ arr1(A) and  $\beta$ arr2 (B) susturulmuş hücrelerde cAMP seviyeleri; kontrol siRNA uygulanmış hücrelerde ve  $\beta$ arr1(C) and  $\beta$ arr2 (D) susturulmuş hücrelerde IP seviyeleri gösterilmektedir. Bütün gruptaki örnek sayısı 3'tür.

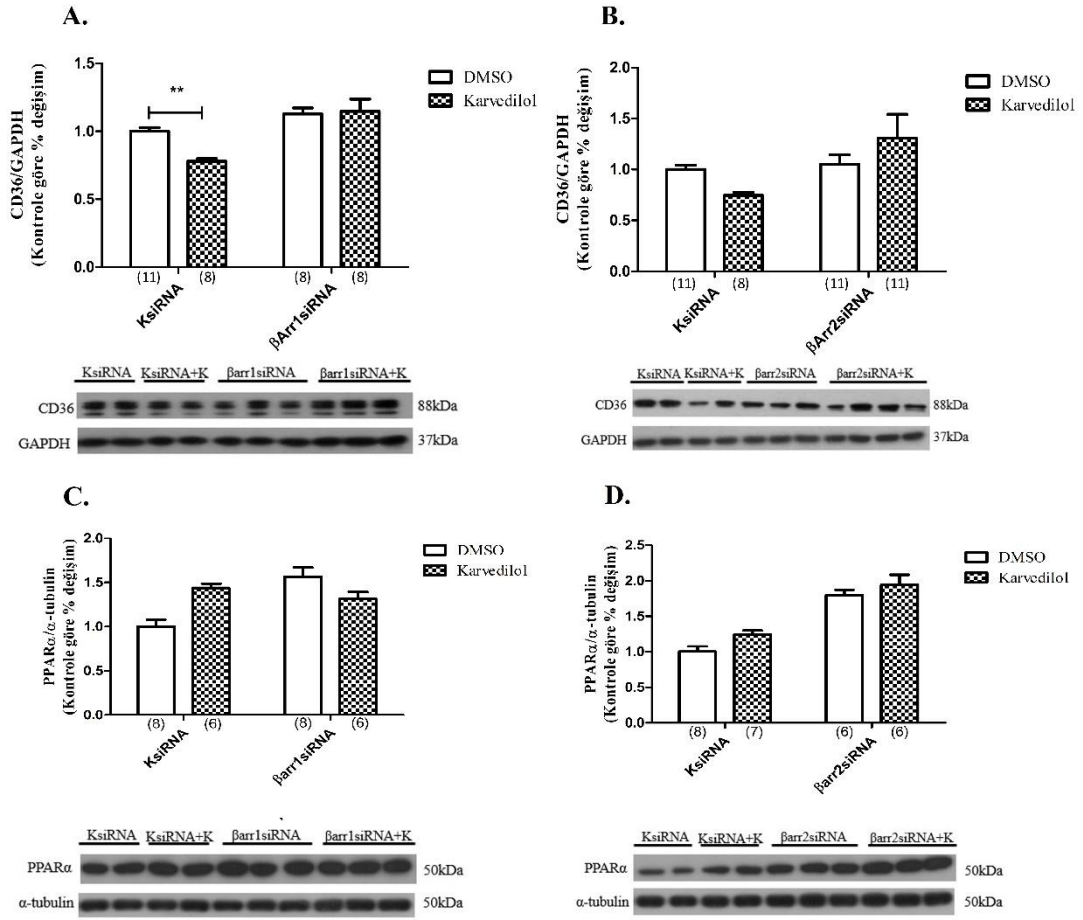
### **3.12. C2C12 Hücrelerinde $\beta$ Arrestin Proteinlerinin Susturulmasının Substrat Metabolizmasında Rolü Olan Proteinlere Etkisi**

KsiRNA uygulanmış hücreler ile  $\beta$ arr proteinleri susturulmuş hücrelere karvedilol uygulaması yapılarak metabolizmada rolü olan proteinlerin değişimi değerlendirilmiştir. Bu amaçla yağ asidi kullanımını gösteren proteinlerden CD36 ve PPAR $\alpha$ ; glukoz kullanımını gösteren proteinlerden GLUT1 miktarları değerlendirilmiştir.

#### **3.12.1. Yağ Asidi Kullanımına Etkisi**

KsiRNA grubunda karvedilol uygulanması CD36 protein miktarında azalmaya yol açarken;  $\beta$ arr1 proteinlerinin susturulduğu grupta bu azalma gözlenmemiştir (Şekil 3.12A). Bu azalma eğilimi  $\beta$ arr2 susturulmuş hücrelerde de gözlenmiştir ancak istatistiksel anlamlılık bulunmamaktadır (Şekil 3.12B). PPAR $\alpha$  protein miktarları da  $\beta$ arr1 (Şekil 3.12C) ve  $\beta$ arr2 (Şekil 3.12D) susturulmuş hücrelerde incelenmiş, kontrol grubu ile aralarında farklılık tespit edilememiştir.

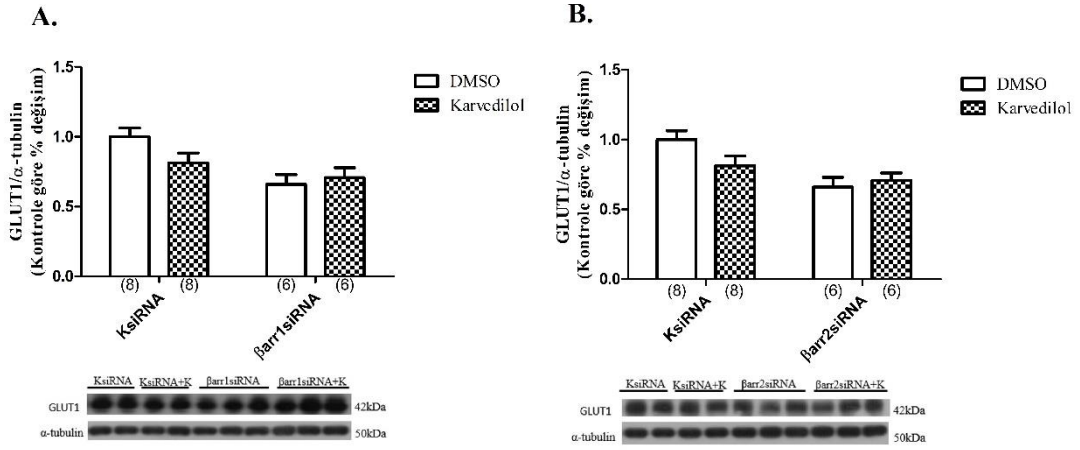




**Şekil 3.12.** Hücrelerde Yağ Asidi Metabolizmasında Görevli Proteinler. Karvedilol uygulaması ile CD36 proteininin  $\beta$ arr1 (A) ve  $\beta$ arr2 (B) susturulmuş hücrelerdeki değişimi; PPAR $\alpha$  proteininin  $\beta$ arr1 (C) ve  $\beta$ arr2 (D) susurulmuş hücrelerdeki değişimi ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı parantez içerisinde belirtilmiştir.

### 3.12.2. Glukoz Kullanımına Etkisi

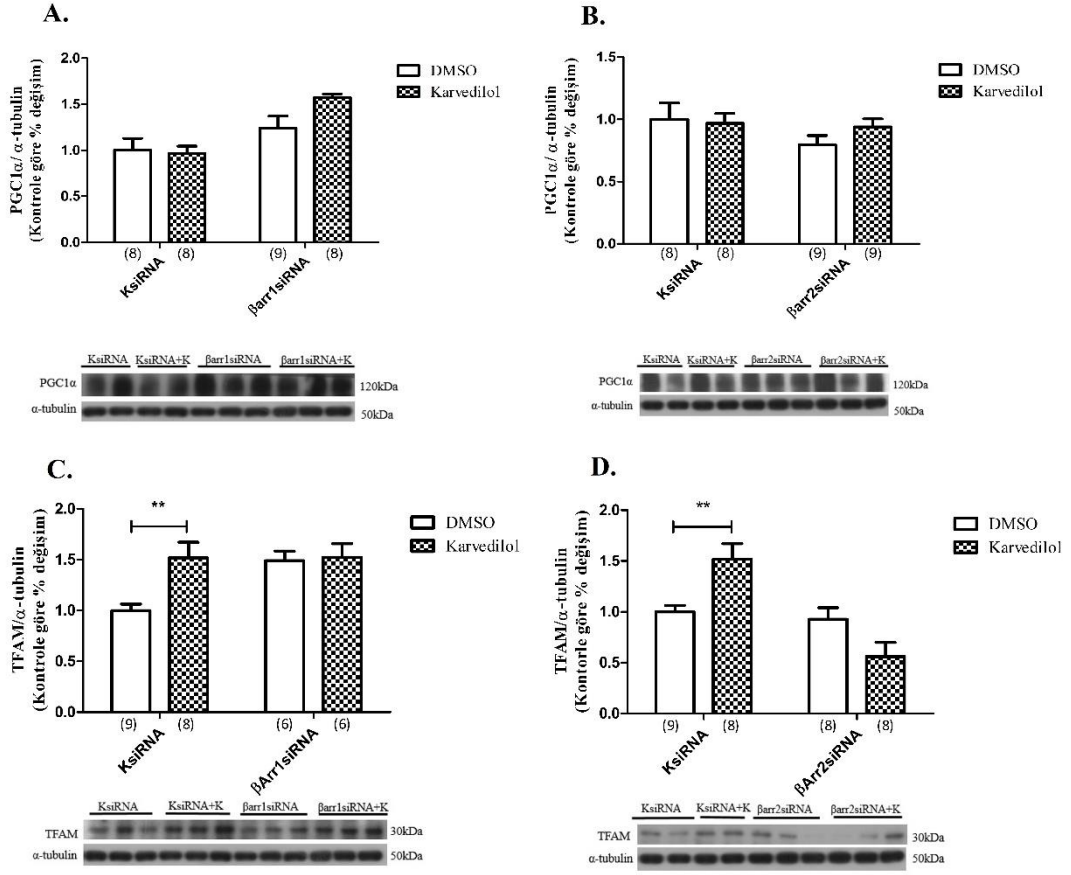
Hücre içine glukoz taşınmasından sorumlu proteinlerden biri olan GLUT1 miktarları  $\beta$ arr1 (Şekil 3.13A) ve  $\beta$ arr2 (Şekil 3.13B) susturulmuş hücrelerde değerlendirilmiştir ancak gruplar arasında farklılık bulunmamıştır.



**Şekil 3.13.** Hücrelerde Glukoz Taşıyıcı Proteinler. Karvedilol uygulaması ile GLUT1 proteininin βarr1 (A) ve βarr2 (B) susturulmuş hücrelerdeki değişimi ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı parantez içerisinde belirtilmiştir.

### 3.13. C2C12 Hücrelerinde β Arrestin Proteinlerinin Susturulmasının Mitokondriyal Biyojenezde Rolü Olan Proteinlere Etkisi

Karvedilolün mitokondriyal biyojenezi tetiklediği bilinmektedir (Yao ve ark., 2016). Bu etkisine βarr proteinlerinin katkısının değerlendirilmesi için; KsiRNA uygulanmış hücelere ve βarr proteinleri susturulmuş hücelere karvedilol uygulamasının ardından mitokondriyal biyojenezde kilit rol oynayan proteinlerden PGC1α ve TFAM protein miktarları değerlendirilmiştir. PGC1α protein miktarları gruplar arasında değişiklik göstermezken (Şekil 3.14A ve Şekil 3.14B), TFAM protein miktarı KsiRNA grubunda karvedilol uygulaması ile artmış; βarr1 (Şekil 3.14C) ve βarr2 (Şekil 3.14D) susturulmuş hücelerde ise bu artış gözlenmemiştir.



**Şekil 3.14.** Hücrelerde Mitokondriyal Biyojenizde Görevli Proteinler.

Karvedilol uygulaması ile PGC1 $\alpha$  proteininin  $\beta$ arr1 (A) ve  $\beta$ arr2 (B) susturulmuş hücrelerdeki değişimi; TFAM proteininin  $\beta$ arr1 (C) ve  $\beta$ arr2 (D) susurulmuş hücrelerdeki değişimi ve temsili Western blot görüntüleri gösterilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı parantez içerisinde belirtilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA

Çalışmamızda, karvedilolün STZ-diyabetik sıçanların kardiyak fonksiyonlarına etkisi değerlendirilmiştir. Kronik karvedilol tedavisinin ve diyabetin  $\beta$ arr proteinlerini nasıl etkilediği sıçan sol ventrikül ve iskelet kası dokusunda incelenmiştir. Beta arrestin *biased* agonizmanın göstergelerinden biri olan ERK fosforilasyonundaki değişimler tespit edilmiştir. Karvedilolün yağ asidi ve glukoz kullanımına olası etkileri aynı şekilde sol ventrikül ve iskelet kası dokusunda değerlendirilmiştir. Beta arrestin proteinlerinin karvedilolün metabolik etkilerine katkısının değerlendirilmesi için siRNA metodu ile  $\beta$ arr proteinleri susturulmuş ve metabolizma ile ilgili protein miktarları tayin edilmiştir.

Bu çalışmada, karvedilolün diyabetik sıçanlarda bazal hemodinamik parametreleri iyileştirdiği gösterilmiştir. Huang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada karvedilol tedavisinin erken diyabetik kardiyak bozulmayı engellediğini ve bazal kardiyak fonksiyonu iyileştirdiğini göstermiştir (Huang ve ark., 2007). Bu çalışmada ise karvedilol tedavisine diyabet oluşumunun sekizinci haftasında başlanmış, kardiyak fonksiyon bozukluğunun tedavi ile geri çevrildiği gösterilmiştir. Oluşturduğumuz STZ-diyabet modelinin kardiyak fonksiyonları bozduğu, LVDP ve  $+dp/dt$  değerlerinin kontrolden düşük,  $-dp/dt$  değerlerinin ise kontrolden fazla olmasından anlaşılmaktadır. Karvedilol bazal seviyelerde bu parametreleri düzeltmiştir.

Kalbin artan metabolik ihtiyaca karşı yanıt verebilme kapasitesinin (miyokard rezervinin) değerlendirilmesi için artan dozlarda  $\beta$ -agonist uygulanması literatürde kullanılan bir yöntemdir (Bombicino ve ark., 2016 ve Jain ve ark., 2001). Kalplerin performansına ilişkin bu değerlendirmenin yapılabilmesi için bazal değerlerin

yanısıra, perfüzyon ortamına kümülatif olarak artan dozlarda izoproterenol eklenmiş ve yanıtlar değerlendirilmiştir. Hemen hemen her konsantrasyonda diyabetik kalplerde kontrole kıyasla  $+dp/dt$  düşük,  $-dp/dt$  değerleri ise yüksektir. Benzer şekilde LVDP değerleri de  $10^{-6}$  M dozu haricinde diyabetik kalplerde kontrole göre daha düşüktür. LVDP ve  $\pm dp/dt$  değerleri karvedilol ile tedavi edilen diyabetik kalplerde kontrollerle aynı bulunmuştur. Karvedilol tedavili diyabetik kalplerde LVDP değeri  $10^{-6}$  M dozda kontrolden düşük,  $-dp/dt$  değeri ise  $10^{-7}$  M dozda kontrollerden yüksek bulunmuş olmasına rağmen, diğer dozlarda yanıtların kontrol kalplerden farklı olmadığı gözlenmiştir.

Giriş bölümünde detaylandırıldığı gibi  $\beta$ arr proteinleri GPCR'lerin hem desensitizasyonundan, hem de bazı sinyal yollarının aktive edilmesinden sorumludur (Andresen, 2011; DeWire ve ark., 2007 ve DeWire ve Violin, 2011). Bir ligand reseptörüne bağlandığında bu proteinlerden herhangi biri aracılığı ile sinyal başlatıyorsa *biased* ligand olarak adlandırılmaktadır (Andresen, 2011). Üçüncü jenerasyon  $\beta$ -blokörler olarak bilinen karvedilol ve nebivolol  $\beta$ arr *biased* agonist olarak tanımlanmıştır (Erickson ve ark., 2013 ve Wisler ve ark., 2007). Daha önce de değinildiği gibi karvedilol diğer  $\beta$ -blokörlerden farklı olarak insülin duyarlılığını bozmamakta, diyabete neden olmamakta ve metabolik profili iyileştirmektedir (Jacob ve ark., 1996; Lithell ve ark., 1992; Samuelsson ve ark., 1994 ve Torp-Pedersen ve ark., 2005). Ayrıca karvedilolün substrat metabolizması üzerine olan etkilerinin incelendiği ve propranolol, bisoprolol ve prazosin ile kıyaslandığı bir çalışmada, glikolizi tetiklerken yağ asidi oksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Onay-Besikci ve ark., 2012). Substrat metabolizması üzerindeki bu etki, karvedilolün ayrıcalıklı bir  $\beta$ -blokör olduğunu gösterse de bu etkinin mekanizmasının tespiti önemlidir. Bu tez çalışmasında karvedilolün substrat mekanizması üzerinde oluşturduğu etkiler  $\beta$ arr proteinleri kapsamında değerlendirilmiş ve karvedilolün  $\beta$ arr proteinleri aracılığı ile yağ asidi kullanımını azalttığı gözlenmiştir.

Beta-blokörlerin endojen katekolaminlerin  $\beta$  reseptörler aracılığı ile ortaya çıkardıkları etkileri engelledikleri ve  $\beta$  reseptör sayısını artırdıkları bilinmektedir (Katzung, 2015). Karvedilol de  $\beta$ -AR'lere antagonisttir ve kronik kullanımda *rebound* etki ile reseptör sayısının artmasına neden olur. Reseptör sayısının artması ise desensitizasyon mekanizmasını aktive ederek  $\beta$ arr proteinlerini artırmış olabilir.

Diyabetik hayvanlarda  $\beta$ arr2 miktarının sol ventrikülde ve iskelet kasında,  $\beta$ arr1 miktarının ise iskelet kasında düşük olduğu gösterilmiştir. Diyabetik hayvanların sol ventrikül ve iskelet kas dokularında  $\beta$ arr2 miktarındaki bu düşüşe, CD36 miktarları artarak eşlik etmiştir. Bununla birlikte, PPAR $\alpha$  seviyeleri de diyabetik hayvanların iskelet kasında yükselmiştir. Bu durum diyabette yağ asidi kullanımının arttığını göstermektedir. Karvedilol tedavisi uygulanmış diyabetik hayvanlarda sol ventrikül dokusunda  $\beta$ arr2 miktarındaki azalmanın önüne geçilmiştir. Ayrıca tedavi diyabette gözlenen CD36 miktarlarındaki artışı önlemiştir. Benzer durum iskelet kasında da gözlenmiş, karvedilol tedavisi her iki  $\beta$ arr izoformunu da kontrol seviyelerine ulaştırmıştır. Karvedilol tedavisi uygulanan diyabetik grupta CD36 ve PPAR $\alpha$  seviyeleri kontrollerden farksızdır.

Karvedilolün yağ asidi metabolizması üzerindeki bu etkileri hücre serilerinde de tespit edilmiştir. Kontrol siRNA uygulanmış C2C12 hücrelerde karvedilol uygulaması CD36 miktarını azaltmıştır. İskelet kası öncülü olan bu hücrelerde  $\beta$ arr1 proteinleri susturulduğu zaman bu azalmanın gözlenmemesi iskelet kasında karvedilolün bu etkisine  $\beta$ arr1 proteininin aracılık ettiğini göstermektedir.

2005 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, New York Kalp Birliği sınıflandırmasına göre sınıf II ve sınıf III kalp yetmezliği olan hastalar karvedilol ile dört ay tedavi edilmiş, miyokardiyal yağ asidi kullanımından laktat kullanımına

kayma gerçekteştiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar miyokardiyal yağ asidi kullanımını üzerindeki bu etkiyi sempatik aktivitenin azalması ile ilişkilendirmişler ve yağ asidi oksidasyonunda görev alan enzimlerin miktarının karvedilol aracılığı ile düşmüş olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (Al-Hesayen ve ark., 2005). Bu tez çalışmasında daha önce yapılan araştırmalara benzer şekilde karvedilolün yağ asidi kullanımını azalttığı gösterilmiştir. Bu bilgilere ek olarak karvedilolün bu etkisinin mekanizmasına  $\beta$ arr proteinlerinin dahil olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Karvedilolün glikoliz hızını artırmasının glikolitik enzimlere doğrudan etkisinden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi için glikolitik yolakta görev alan enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Glukozun hücre içine alınmasından sonra geri dönüşümsüz olarak fosforilasyonuna aracılık eden HK ve fruktoz-6-fosfatı frukto-1,6-difosfata dönüştüren PFK enzim aktivitesi, karvedilol tedavisinden ve diyabetten anlamlı olarak etkilenmemişlerdir. PK enzim aktivitesi ise diyabetik hayvanların sol ventriküllerinde azalmıştır. Karvedilol tedavisi almış olan gruplarda sol ventrikülde PKaktivitesi artmıştır.  $\beta$ arr miktarları ile korelasyon gösteren bu sonuçlar, karvedilolün metabolik-modülatör etkilerine  $\beta$ arr proteinlerinin aracılık ettiğine işaret etmektedir.

Yapılan son çalışmalarda  $\beta$ arr proteinlerinin kalp fizyolojisindeki işlevlerinin farklı olabileceğine dair çeşitli yorumlar yapılmıştır. Örneğin,  $\beta$ arr1'in kalp yetmezliği patolojisinde, inotropik yanıtı azalttığı, kardiyak apoptozisi tetiklediği, kardiyak kontraktiletiyi azalttığı ve bu nedenle kardiyotoksik olabileceği yorumu yapılmıştır. Tam tersine,  $\beta$ arr2  $\beta_1$ -AR desensitizasyonuna ve sayısının azalmasına aracılık etmemekte, EGFR transaktivasyonunu tetikleyerek sağ kalım etkisini başlatmakta ve SERCA2a aktivitesinin artmasına aracılık ederek kontraktiletiyi artırmaktadır. Bu da  $\beta$ arr2'nin kardiyoprotektif olduğunu göstermektedir (Bathgate-Siryk ve ark., 2014). Çalışmamızda, karvedilol tedavisinin kalpte diyabetle azalan

$\beta$ arr2 miktarını artırdığı ve  $\beta$ arr1 seviyelerinde ise değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir.

Diyabet ve insülin rezistansı ile  $\beta$ arr proteinleri arasındaki ilişki daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir. Örneğin tip 2 diyabet modeli olan db/db farelerde ve yüksek yağlı diyetle oluşturulan obezite modellerinde  $\beta$ arr2 mRNA ve protein miktarlarının düşük olduğu,  $\beta$ arr2 susturulmuş farelerde glukoz kullanımının daha az olduğu, insülin duyarlılığının da bozulduğu gözlenmiştir (Luan ve ark., 2009). Bir diğer çalışmada ise  $\beta$ arr1'in adipojenezi ve diyetle indüklenen obeziteyi baskıladığı, glukoz toleransı ve insülin duyarlılığını ise PPAR $\gamma$  ile etkileşerek iyileştirdiği gösterilmiştir. Yine aynı grup, metabolik genlerin PPAR $\gamma$  aracılı ekspresyonlarının ancak  $\beta$ arr1 varlığında gerçekleşebileceğini göstermiş ve  $\beta$ arr1'in obezite ve diğer metabolik bozukluklarda koruyucu etkinliğinin olabileceği iddia etmiştir (Zhuang ve ark., 2011a ve Zhuang ve ark., 2011b). Bu çalışmalar,  $\beta$ arr proteinlerinin insülin salımı ve duyarlılığı ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymakta ve karvedilolün metabolik avantajlarının  $\beta$ arr *biased* agonist olmasından kaynaklanıyor olabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında, diyabette  $\beta$ arr protein miktarının azaldığı ve yağ asidi kullanımının arttığı gösterilmiştir. Kronik karvedilol tedavisi, azalan  $\beta$ arr miktarlarını artırmış ve yağ asidi kullanımını da azaltmıştır.

ERK fosforilasyonu,  $\beta$ arr aracılı hücre içi sinyal yolağının ve *biased* agonist sinyalinin en önemli göstergelerinden biridir (Erickson ve ark., 2013 ve Wisler ve ark., 2007). Karvedilolün de  $\beta$ arr aracılı olarak ERK fosforilasyonunu uyardığı bilinmektedir (Wisler ve ark., 2007). Çalışmamızda, ERK fosforilasyonunun diyabetik kalplerde arttığı ve kronik karvedilol tedavisinin diyabetik kalplerde gözlenen bu artışı geri çevirdiği gösterilmiştir. Beta arrestin *biased* agonist olan karvedilolün kronik kullanımda fosforile-ERK düzeylerinde azalmaya yol açması çelişkili bir durum olarak gözükmektedir. Sonrasında Langendorff perfüzyon modelinde kontrol ve diyabetik kalplere akut olarak karvedilol uygulanması kontrol



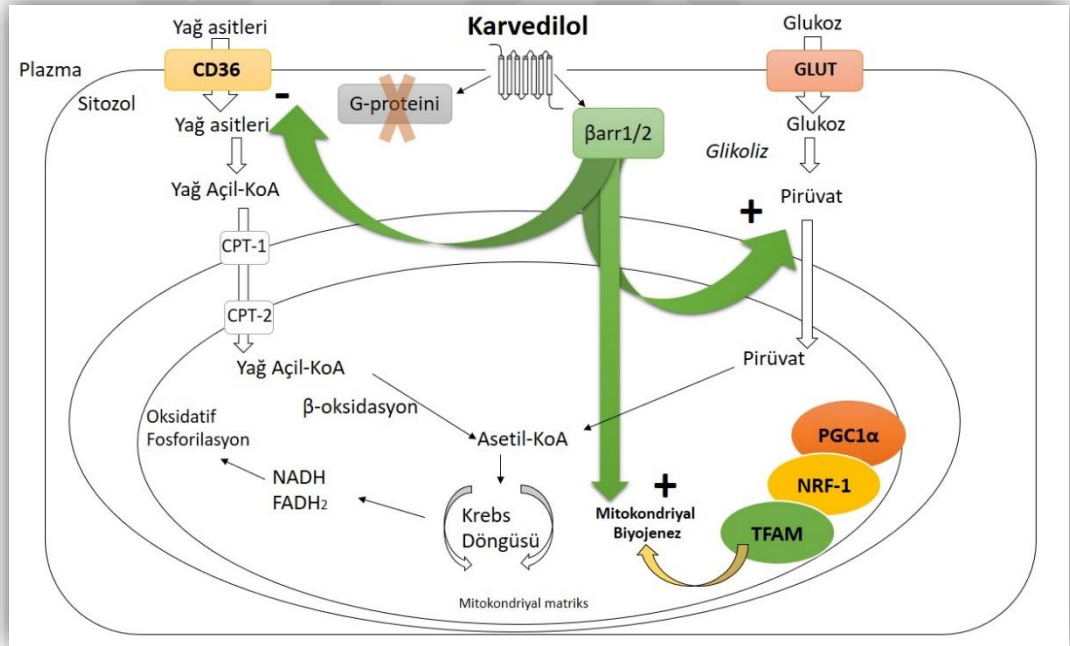
kalplerde daha belirgin olmak üzere ERK fosforilasyonunda artışa yol açmıştır. Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere, kronik tedavinin aksine, karvedilol akut etkisi ile  $\beta$ arr aracılı olarak ERK fosforilasyonunu kısa süreli olarak tetiklemektedir. C2C12 hücrelerde karvedilolün ERK fosforilasyonunu zamana bağlı olarak ve kısa süreliğine uyarması da bu durumu desteklemektedir.

Kontrol sıçan kalplerinde iskemi koşullarında ERK fosforilasyon miktarında bir değişiklik olmazken, diyabette iskemi sonrasında fosforilasyon miktarının arttığı gösterilmiştir (Strniskova ve ark., 2003). Ayrıca, obezite ve insülin direncinde ortaya çıkan kardiyak fonksiyon bozukluğunun artan ERK sinyali ile ilişki olduğu da bilinmektedir (Sundgren ve ark., 2003). Karvedilolün hiperinsülinemi durumunda ERK aktivasyonunu azalttığı da gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017b). Tüm bu çalışmalar ve ERK'in bir proliferasyon ve hipertrofi belirteci olduğu (Barry ve ark., 2008) göz önünde bulundurulduğunda kronik karvedilol tedavisinin ERK fosforilasyonunu azaltması şaşırtıcı değildir.

İskelet kası ve adipoz dokuda bozulan mitokondriyal biyojenez, substrat metabolizmasındaki problemlere eşlik etmekte ve hatta bu problemlere neden olabilmektedir (Choo ve ark., 2006; Lowell ve Shulman, 2005 ve Sivitz ve Yorek, 2010). Karvedilolün endotel hücre serisi olan HUVEC hücre hattında mitokondriyal biyojenezi stimüle ettiği gösterilmiştir (Yao ve ark., 2016). PGC1 $\alpha$ , mitokondriyal biyojenezi düzenleyen transkripsiyon faktörlerinden NRF1 ve NRF2'nin aktivatörüdür (Duncan ve ark., 2007 ve Wu ve ark., 1999). NRF1 ise TFAM'ı aktive etmektedir (Scarpulla, 2002). Yao ve arkadaşları karvedilol uygulaması ile PGC-1 $\alpha$ , NRF1 ve TFAM düzeylerinde artış olduğunu göstermişlerdir (Yao ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında, karvedilolün mitokondriyal biyojenez üzerine olan etkisinin  $\beta$ arr proteinleri ile ilgisi araştırılmıştır. Karvedilolün, fare miyoblast hücresi olan C2C12'lerde PGC1 $\alpha$  miktarlarında değişikliğe neden olmasa da, kontrol grupta TFAM miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Bu artışın  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 susturulmuş

hücrelerde ortadan kalkması,  $\beta$ arr1 ve  $\beta$ arr2 proteinlerinin karvedilolün bu etkisinde payı olduğunu göstermiştir.

Özetle, bu tez çalışmasında karvedilolün diyabetik kalpte gözlenen fonksiyon bozukluğunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Karvedilolün substrat metabolizması üzerindeki olumlu etkisinin, kardiyak fonksiyonu iyileştirici etkisi ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ve bu etkinin mekanizması araştırılmıştır. Karvedilol tedavisi, diyabette artan yağ asidi kullanımında azalmaya neden olmuştur. Bu azalmaya kalpte  $\beta$ arr2'nin, iskelet kaslarında ise her iki  $\beta$ arr proteininin aracılık ettiği tespit edilmiştir. Karvedilolün mitokondriyal biyojenezi artırıcı etkisine ise her iki  $\beta$ arr proteininin de dahil olduğu C2C12 hücrelerinde gösterilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Karvedilolün  $\beta$ arr Aracılı Etkileri.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, karvedilolün insülin rezistansı ve diyabet üzerinde olumlu etkileri olan kardiyovasküler bir ilaç olmasından ve karvedilolün hücre içindeki bazı etkilerine aracılık ettiğini bildiğimiz  $\beta$ arr proteinlerinin de insülin rezistansı ve obeziteyi engellemesinden yola çıkarak tasarlanmıştır. Karvedilolün kardiyovasküler ve metabolik etkilerine  $\beta$ arr proteinlerinin ne ölçüde aracılık ettiğini tespit etmek hedeflenmiştir.

Bu hedeflere yönelik olarak oluşturulan diyabet modelinde, sol ventrikül ve iskelet kasında  $\beta$ arr2 proteinlerinin diyabet ile azaldığı ve karvedilol tedavisi ile bu azalmanın engellendiği gösterilmiştir.  $\beta$ arr1 proteini ise iskelet kasında diyabet ile azalmış, aynı şekilde karvedilol tedavisi ile bu azalma engellenmiştir. Her iki dokuda da,  $\beta$ arr proteinlerinin diyabet ile azalmasına yağ asitlerinin hücre içine alınmasından sorumlu olan CD36 miktarındaki artış eşlik etmiştir. Karvedilol tedavisi ile CD36 miktarındaki artış engellenmiştir.  $\beta$ arr proteinlerinin bu etkilere ne ölçüde aracılık ettiğini ortaya çıkarabilmek için C2C12 hücrelerde  $\beta$ arr proteinleri susturularak karvedilol uygulanmış, karvedilolün  $\beta$ arr proteinleri olmadan CD36'ları azaltmadığı ve mitokondriyal biyogenez faktörü TFAM'ı indüklemediği tespit edilmiştir.

Karvedilolün substrat metabolizması üzerindeki etkilerinin metoprolol ya da propranolol ile değil prazosin ile görülmesi, bu etkilere  $\alpha$ -AR'lerin de dahil olduğuna işaret etmektedir.  $\alpha$ -AR'lerin hücre içi sinyal iletimine  $\beta$ arr proteinleri katkıda bulunuyor olabilir. Bundan sonraki çalışmalarda bu ortak etkilerin mekanizmasının da araştırılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, glukozun hücre içine alınmasından sorumlu proteinlerden biri olan GLUT1'in STZ-diyabetten ve karvedilol tedavisinden nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Ayrıca  $\beta$ arr proteinleri susturulmuş hücrelerde de GLUT1 seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu dokularda glukozun hücre içine transportundan sorumlu olan diğer proteinlerin de benzer şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir.

Özet olarak bu çalışmada karvedilolün bir *biased* agonist olduğu, metabolik etkilerinden bazılarını G-proteini aracılığıyla değil, ERK fosforilasyonu ve  $\beta$ arr proteinleri aracılığıyla gerçekleştiriyor olabileceği ortaya konulmuştur. Ayrıca,  $\beta$ arr proteinlerinin aracılık ettiği fizyolojik olayların mekanizmasının araştırılması, yalnızca bu proteinleri hedefleyen yeni moleküllerin geliştirilmesini ve diyabet gibi metabolik bozukluk gözlenen hastalıklarda kullanılabilmesini sağlayacaktır.

## ÖZET

### **Karvedilolün Metabolik ve Kardiyovasküler Etkilerine Beta-Arrestinlerin Katkısının İncelenmesi**

Karvedilol, kalp yetmezliği, hipertansiyon ve miyokard infarktüs sonrasında gelişen ventriküler fonksiyon bozukluklarının engellenmesi için kullanılmaktadır. Kronik kullanımda diğer  $\beta$ -blokörlerle ortaya çıkabilen insülin rezistansı ya da diyabet gibi metabolik bozukluklara yol açmamaktadır. Adrenerjik reseptörleri antagonize ederken, hücre içinde  $\beta$ arr proteinleri aracılığıyla “agonist” gibi davrandığı gösterilmiş olan karvedilol *biased* agonist olarak adlandırılmıştır.  $\beta$ arr proteinleri ise, bazı reseptörlerle ( $\beta_2$ -AR gibi) oluşturdukları yapı nedeniyle hücre içinde yaygın etkili sinyalizasyonları (ERK gibi) başlatan proteinlerdir.  $\beta$ arr proteinlerinin düzenledikleri fizyolojik olaylar yeterince bilinmemekle birlikte  $\beta$ arr1 ve/veya  $\beta$ arr2 eksikliği ile insülin rezistansı ve obezite arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Karvedilol de kardiyovasküler ve metabolik olarak üstün özelliklerini  $\beta$ arr proteinlerine agonist etkisi nedeniyle kazanıyor olabilir. Karvedilolün miyosit hücrelerde, glukoz kullanımını artırdığı, yağ asidi kullanımını ise azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada metabolik bozulma sıçanlarda STZ-diyabet modeli ile oluşturulmuş, diyabet ve karvedilol tedavisinin  $\beta$ arr proteinleri ve metabolizma üzerine etkileri incelenmiştir. Karvedilolün glukoz ve yağ kullanımı üzerindeki etkileri, bu yolların düzenlenmesinde en önemli rolü üstlenen proteinler düzeyinde incelenmiştir ve bu etkilere  $\beta$ arr proteinlerinin ne ölçüde aracılık ettiği belirlenmiştir. Bu amaçla, C2C12 hücrelerde siRNA tekniği kullanılmıştır. Bu tez çalışmasının sonucuna göre karvedilol diyabetik kalpteki fonksiyon bozukluklarını iyileştirmiştir ve bunun gerçekleşmesine substrat metabolizması üzerindeki yararlı etkileri katkıda bulunmaktadır. Kalpte, diyabette artan CD36 seviyelerini azaltması karvedilolün yağ asidi kullanımını azalttığını ve bunu  $\beta$ arr2 proteinleri aracılığı ile yaptığını göstermektedir. İskelet kasında ise bu azalmaya her iki  $\beta$ arr izoformunda artma eşlik etmektedir. Karvedilol uygulamasının TFAM protein ekspresyonunu artırarak mitokondriyal biyogenez tetiklediği ve bu artışın da  $\beta$ arr aracılığı ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, karvedilolün metabolizma üzerindeki olumlu etkilerine  $\beta$ arr proteinlerinin katkıda bulunduğunu gösterilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Beta arrestin; *Biased* agonist; ERK; Karvedilol; Tip 1 diyabet

## SUMMARY

### **Investigation of the Contribution of Beta-Arrestin Proteins on Cardiovascular and Metabolic Effects of Carvedilol**

Carvedilol is used for the treatment of heart failure, hypertension and to prevent ventricular dysfunction that can develop after myocardial infarction. It is preferable since it does not cause metabolic disorders such as insulin resistance or diabetes which can occur with other  $\beta$ -blockers in chronic use. Carvedilol antagonises the adrenergic receptors while behaving like “agonist” through activating  $\beta$ arrs. Beta arrestins are proteins that initiate common intracellular signaling (such as ERK) because of their interaction with some receptors (such as  $\beta_2$ -AR). The physiological events that  $\beta$ arrs regulate are not well understood. However, insulin resistance or obesity are closely associated with  $\beta$ arr1 and/or  $\beta$ arr2 deficiency. We hypothesised that cardiovascular and metabolic advantages of carvedilol may be mediated by its agonist effect on  $\beta$ arrs. In a previous study, carvedilol increased glucose utilization and decreased fatty acid utilization in myocyte cells. In this study, metabolic deterioration was simulated with STZ-diabetes model in rats. The effects of diabetes and carvedilol treatment on  $\beta$ arr proteins and metabolism were investigated. siRNA technique on C2C12 cell lines were used to examine the effects of carvedilol on glucose and fatty acid utilization. For this purpose, interaction between the major proteins on these pathways and  $\beta$ arrs was evaluated. Our study showed that carvedilol prevented the functional deterioration in diabetic hearts. We believe that this is mediated by carvedilol’s modulatory effect on substrate metabolism. A decrease in CD36 protein level with carvedilol treatment in diabetic hearts indicates that carvedilol decreases fatty acid utilization and stimulates glucose usage. This effect seems to be mediated by  $\beta$ arr2 in the heart. Moreover, modulatory effect of carvedilol on substrate metabolism is confirmed by a decrease in both  $\beta$ arrs which was accompanied by an increase in CD36 in skeletal muscles of diabetic animals. The decrease in  $\beta$ arrs and elevation in CD36 was prevented by carvedilol treatment. We showed that TFAM was stimulated in the cells incubated with carvedilol and this effect was not observed in  $\beta$ arr1 and  $\beta$ arr2 knockdown cells indicating that mitochondrial biogenesis is controlled by both isoforms of  $\beta$ arrs. Our results show that,  $\beta$ arr proteins contribute to the positive effects of carvedilol on metabolism.

**Keywords:** Beta arrestin; *Biased* agonist; Carvedilol; ERK; Type 1 diabetes

## KAYNAKLAR

- ABBOTT, BD (2009). Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol*, **27**: 246-57.
- ABUMRAD, NA & GOLDBERG, IJ (2016). CD36 actions in the heart: Lipids, calcium, inflammation, repair and more? *Biochim Biophys Acta*, **1861**: 1442-9.
- AGUER, C, FORETZ, M, LANTIER, L, HEBRARD, S, VIOLLET, B, MERCIER, J & KITZMANN, M (2011). Increased FAT/CD36 cycling and lipid accumulation in myotubes derived from obese type 2 diabetic patients. *PLoS One*, **6**: e28981.
- AGUER, C, MERCIER, J, MAN, CY, METZ, L, BORDENAVE, S, LAMBERT, K, JEAN, E, LANTIER, L, BOUNOUA, L, BRUN, JF, RAYNAUD DE MAUVERGER, E, ANDREELLI, F, FORETZ, M & KITZMANN, M (2010). Intramyocellular lipid accumulation is associated with permanent relocation ex vivo and in vitro of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in obese patients. *Diabetologia*, **53**: 1151-63.
- AHN, S, SHENOY, SK, WEI, H & LEFKOWITZ, RJ (2004a). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem*, **279**: 35518-25.
- AHN, S, WEI, H, GARRISON, TR & LEFKOWITZ, RJ (2004b). Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *J Biol Chem*, **279**: 7807-11.
- AL-HESAYEN, A, AZEVEDO, ER, FLORAS, JS, HOLLINGSHEAD, S, LOPASCHUK, GD & PARKER, JD (2005). Selective versus nonselective beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure: differential effects on myocardial energy substrate utilization. *Eur J Heart Fail*, **7**: 618-23.
- ANDRESEN, BT (2011). A pharmacological primer of biased agonism. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **11**: 92-8.
- ANGUERA, I, MAGRINA, J, SETOAIN, FJ, ESMATGES, E, PARE, C, VIDAL, J, AZQUETA, M, GARCIA, A, GRAU, JM, VIDAL-SICART, S & BETRIU, A (1998). [Anatomopathological bases of latent ventricular dysfunction in insulin-dependent diabetics]. *Rev Esp Cardiol*, **51**: 43-50.
- A Study to Explore the Efficacy of TRV027 in Patients Hospitalized for Acute Decompensated Heart Failure (BLAST-AHF) Erişim Adresi: [\[https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01966601\]](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01966601), Erişim Tarihi: 28/09/2019

- ATKINSON, LL, FISCHER, MA & LOPASCHUK, GD (2002). Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *J Biol Chem*, **277**: 29424-30.
- AVOGARO, A, NOSADINI, R, DORIA, A, FIORETTO, P, VELUSSI, M, VIGORITO, C, SACCA, L, TOFFOLO, G, COBELLI, C, TREVISAN, R & ET AL. (1990). Myocardial metabolism in insulin-deficient diabetic humans without coronary artery disease. *Am J Physiol*, **258**: E606-18.
- AZZI, M, CHAREST, PG, ANGERS, S, ROUSSEAU, G, KOHOUT, T, BOUVIER, M & PINEYRO, G (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 11406-11.
- BAAR, K, WENDE, AR, JONES, TE, MARISON, M, NOLTE, LA, CHEN, M, KELLY, DP & HOLLOSZY, JO (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*, **16**: 1879-86.
- BAKER, JG, HALL, IP & HILL, SJ (2003). Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol*, **64**: 1357-69.
- BARGER, PM, BRANDT, JM, LEONE, TC, WEINHEIMER, CJ & KELLY, DP (2000). Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest*, **105**: 1723-30.
- BARRY, SP, DAVIDSON, SM & TOWNSEND, PA (2008). Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, **40**: 2023-39.
- BATHGATE-SIRYK, A, DABUL, S, PANDYA, K, WALKLETT, K, RENGO, G, CANNAVO, A, DE LUCIA, C, LICCARDO, D, GAO, E, LEOSCO, D, KOCH, WJ & LYMPEROPOULOS, A (2014). Negative impact of beta-arrestin-1 on post-myocardial infarction heart failure via cardiac and adrenal-dependent neurohormonal mechanisms. *Hypertension*, **63**: 404-12.
- BENOVIC, JL, KUHN, H, WEYAND, I, CODINA, J, CARON, MG & LEFKOWITZ, RJ (1987). Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**: 8879-82.
- BLACK, JW & PRICHARD, BN (1973). Activation and blockade of beta adrenoceptors in common cardiac disorders. *Br Med Bull*, **29**: 163-7.
- BOHN, LM, LEFKOWITZ, RJ, GAINETDINOV, RR, PEPPEL, K, CARON, MG & LIN, FT (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science*, **286**: 2495-8.
- BOLOGNA, Z, TEOH, JP, BAYOUMI, AS, TANG, Y & KIM, IM (2017). Biased G Protein-Coupled Receptor Signaling: New Player in Modulating Physiology and Pathology. *Biomol Ther (Seoul)*, **25**: 12-25.
- BOMBICINO, SS, IGLESIAS, DE, MIKUSIC, IAR, D'ANNUNZIO, V, GELPI, RJ, BOVERIS, A & VALDEZ, LB (2016). Diabetes impairs heart mitochondrial



- function without changes in resting cardiac performance. *Int J Biochem Cell Biol*, **81**: 335-345.
- BONEN, A, JAIN, SS, SNOOK, LA, HAN, XX, YOSHIDA, Y, BUDDO, KH, LALLY, JS, PASK, ED, PAGLIALUNGA, S, BEAUDOIN, MS, GLATZ, JF, LUIKEN, JJ, HARASIM, E, WRIGHT, DC, CHABOWSKI, A & HOLLOWAY, GP (2015). Extremely rapid increase in fatty acid transport and intramyocellular lipid accumulation but markedly delayed insulin resistance after high fat feeding in rats. *Diabetologia*, **58**: 2381-91.
- BONEN, A, LUIKEN, JJ, ARUMUGAM, Y, GLATZ, JF & TANDON, NN (2000). Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem*, **275**: 14501-8.
- BOUVIER, M, HAUSDORFF, WP, DE BLASI, A, O'DOWD, BF, KOBILKA, BK, CARON, MG & LEFKOWITZ, RJ (1988). Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, **333**: 370-3.
- BRAISSANT, O, FOUFELLE, F, SCOTTO, C, DAUCA, M & WAHLI, W (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, **137**: 354-66.
- BRISTOW, MR (2000). beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*, **101**: 558-69.
- BRISTOW, MR, LARRABEE, P, MINOBE, W, RODEN, R, SKERL, L, KLEIN, J, HANDWERGER, D, PORT, JD & MULLER-BECKMANN, B (1992). Receptor pharmacology of carvedilol in the human heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, **19 Suppl 1**: S68-80.
- BUTCHER, AJ, PRIHANDOKO, R, KONG, KC, MCWILLIAMS, P, EDWARDS, JM, BOTTRILL, A, MISTRY, S & TOBIN, AB (2011). Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J Biol Chem*, **286**: 11506-18.
- CALO, LA, SEMPLICINI, A & DAVIS, PA (2005). Antioxidant and antiinflammatory effect of carvedilol in mononuclear cells of hypertensive patients. *Am J Med*, **118**: 201-2.
- CANNON, B, HOUSTEK, J & NEDERGAARD, J (1998). Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Ann N Y Acad Sci*, **856**: 171-87.
- CHOO, HJ, KIM, JH, KWON, OB, LEE, CS, MUN, JY, HAN, SS, YOON, YS, YOON, G, CHOI, KM & KO, YG (2006). Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*, **49**: 784-91.
- COHN, JN, JOHNSON, G, ZIESCHE, S, COBB, F, FRANCIS, G, TRISTANI, F, SMITH, R, DUNKMAN, WB, LOEB, H, WONG, M & ET AL. (1991). A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*, **325**: 303-10.

- CONNER, DA, MATHIER, MA, MORTENSEN, RM, CHRISTE, M, VATNER, SF, SEIDMAN, CE & SEIDMAN, JG (1997). beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ Res*, **81**: 1021-6.
- DEFEA, KA, VAUGHN, ZD, O'BRYAN, EM, NISHIJIMA, D, DERY, O & BUNNETT, NW (2000). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 11086-91.
- DENNIS, SC, GEVERS, W & OPIE, LH (1991). Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *J Mol Cell Cardiol*, **23**: 1077-86.
- DEWIRE, SM, AHN, S, LEFKOWITZ, RJ & SHENOY, SK (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, **69**: 483-510.
- DEWIRE, SM & VIOLIN, JD (2011). Biased ligands for better cardiovascular drugs: dissecting G-protein-coupled receptor pharmacology. *Circ Res*, **109**: 205-16.
- DHALLA, NS, TAKEDA, N, RODRIGUEZ-LEYVA, D & ELIMBAN, V (2014). Mechanisms of subcellular remodeling in heart failure due to diabetes. *Heart Fail Rev*, **19**: 87-99.
- DJOUADI, F, WEINHEIMER, CJ, SAFFITZ, JE, PITCHFORD, C, BASTIN, J, GONZALEZ, FJ & KELLY, DP (1998). A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest*, **102**: 1083-91.
- DU T, LI B, LI H, LI M, HERTZ L, PENG L (2010) Signaling pathways of isoproterenol-induced ERK1/2 phosphorylation in primary cultures of astrocytes are concentration-dependent. *J Neurochem*, **115(4)**:1007–1023.
- DUGGAL, B, GUPTA, MK & NAGA PRASAD, SV (2016). Potential Role of microRNAs in Cardiovascular Disease: Are They up to Their Hype? *Curr Cardiol Rev*, **12**: 304-310.
- DUNCAN, JG, FONG, JL, MEDEIROS, DM, FINCK, BN & KELLY, DP (2007). Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway. *Circulation*, **115**: 909-17.
- EICHEL, K, JULLIE, D & VON ZASTROW, M (2016). beta-Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat Cell Biol*, **18**: 303-10.
- ERICKSON, CE, GUL, R, BLESSING, CP, NGUYEN, J, LIU, T, PULAKAT, L, BASTEPE, M, JACKSON, EK & ANDRESEN, BT (2013). The beta-blocker Nebivolol Is a GRK/beta-arrestin biased agonist. *PLoS One*, **8**: e71980.
- FILLMORE, N, MORI, J & LOPASCHUK, GD (2014). Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol*, **171**: 2080-90.

- FINCK, BN (2007). The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovasc Res*, **73**: 269-77.
- FINCK, BN, LEHMAN, JJ, LEONE, TC, WELCH, MJ, BENNETT, MJ, KOVACS, A, HAN, X, GROSS, RW, KOZAK, R, LOPASCHUK, GD & KELLY, DP (2002). The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **109**: 121-30.
- FISKER, FY, GRIMM, D & WEHLAND, M (2015). Third-generation beta-adrenoceptor antagonists in the treatment of hypertension and heart failure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **117**: 5-14.
- FURMAN, BL (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*, **70**: 5 47 1-20.
- GARESSE, R & VALLEJO, CG (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*, **263**: 1-16.
- GEORGIADI, A & KERSTEN, S (2012). Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv Nutr*, **3**: 127-34.
- GERHARDSTEIN, BL, PURI, TS, CHIEN, AJ & HOSEY, MM (1999). Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*, **38**: 10361-70.
- GESTY-PALMER, D, CHEN, M, REITER, E, AHN, S, NELSON, CD, WANG, S, ECKHARDT, AE, COWAN, CL, SPURNEY, RF, LUTTRELL, LM & LEFKOWITZ, RJ (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem*, **281**: 10856-64.
- GHOSH, S, AN, D, PULINILKUNNIL, T, QI, D, LAU, HC, ABRAHANI, A, INNIS, SM & RODRIGUES, B (2004). Role of dietary fatty acids and acute hyperglycemia in modulating cardiac cell death. *Nutrition*, **20**: 916-23.
- GIUGLIANO, D, ACAMPORA, R, MARFELLA, R, DE ROSA, N, ZICCARDI, P, RAGONE, R, DE ANGELIS, L & D'ONOFRIO, F (1997). Metabolic and cardiovascular effects of carvedilol and atenolol in non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypertension. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, **126**: 955-9.
- GLATZ, JF, LUIKEN, JJ & BONEN, A (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev*, **90**: 367-417.
- GLATZ, JF, NABBEN, M, HEATHER, LC, BONEN, A & LUIKEN, JJ (2016). Regulation of the subcellular trafficking of CD36, a major determinant of cardiac fatty acid utilization. *Biochim Biophys Acta*, **1861**: 1461-71.
- GONG, K, LI, Z, XU, M, DU, J, LV, Z & ZHANG, Y (2008). A novel protein kinase A-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*, **283**: 29028-36.

- GOREN, Y, MEIRI, E, HOGAN, C, MITCHELL, H, LEBANONY, D, SALMAN, N, SCHLIAMSER, JE & AMIR, O (2014). Relation of reduced expression of MiR-150 in platelets to atrial fibrillation in patients with chronic systolic heart failure. *Am J Cardiol*, **113**: 976-81.
- GRIMALDI, PA, TEBOUL, L, GAILLARD, D, ARMENGOD, AV & AMRI, EZ (1999). Long chain fatty acids as modulators of gene transcription in preadipose cells. *Mol Cell Biochem*, **192**: 63-8.
- GRUNDMANN, M, MERTEN, N, MALFACINI, D, INOUE, A, PREIS, P, SIMON, K, RUTTIGER, N, ZIEGLER, N, BENKEL, T, SCHMITT, NK, ISHIDA, S, MULLER, I, REHER, R, KAWAKAMI, K, INOUE, A, RICK, U, KUHL, T, IMHOF, D, AOKI, J, KONIG, GM, HOFFMANN, C, GOMEZA, J, WESS, J & KOSTENIS, E (2018). Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat Commun*, **9**: 341.
- HABETS, DD, COUMANS, WA, VOSHOL, PJ, DEN BOER, MA, FEBBRAIO, M, BONEN, A, GLATZ, JF & LUIKEN, JJ (2007). AMPK-mediated increase in myocardial long-chain fatty acid uptake critically depends on sarcolemmal CD36. *Biochem Biophys Res Commun*, **355**: 204-10.
- HALESTRAP, AP, POOLE, RC & CRANMER, SL (1990). Mechanisms and regulation of lactate, pyruvate and ketone body transport across the plasma membrane of mammalian cells and their metabolic consequences. *Biochem Soc Trans*, **18**: 1132-5.
- HAMILTON, JA (2007). New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **77**: 355-61.
- HERZIG, S, LONG, F, JHALA, US, HEDRICK, S, QUINN, R, BAUER, A, RUDOLPH, D, SCHUTZ, G, YOON, C, PUIGSERVER, P, SPIEGELMAN, B & MONTMINY, M (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, **413**: 179-83.
- HODAVANCE, SY, GARERI, C, TOROK, RD & ROCKMAN, HA (2016). G Protein-coupled Receptor Biased Agonism. *J Cardiovasc Pharmacol*, **67**: 193-202.
- HOLLOWAY, AC, QIAN, HW, PIPOLO, L, ZIOGAS, J, MIURA, SI, KARNIK, S, SOUTHWELL, BR, LEW, MJ & THOMAS, WG (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Molecular Pharmacology*, **61**: 768-777.
- HOW, OJ, AASUM, E, SEVERSON, DL, CHAN, WY, ESSOP, MF & LARSEN, TS (2006). Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice. *Diabetes*, **55**: 466-73.
- HSU, JH, LIOU, SS, YU, BC, CHENG, JT & WU, YC (2004). Activation of alpha1A-adrenoceptor by andrographolide to increase glucose uptake in cultured myoblast C2C12 cells. *Planta Med*, **70**: 1230-3.
- HUANG, C, CHEN, D, XIE, Q, YANG, Y & SHEN, W (2013). Nebivolol stimulates mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **438**: 211-7.

- HUANG, H, SHAN, J, PAN, XH, WANG, HP, QIAN, LB & XIA, Q (2007). Carvedilol improved diabetic rat cardiac function depending on antioxidant ability. *Diabetes Res Clin Pract*, **75**: 7-13.
- HUNTON, DL, BARNES, WG, KIM, J, REN, XR, VIOLIN, JD, REITER, E, MILLIGAN, G, PATEL, DD & LEFKOWITZ, RJ (2005). beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Molecular Pharmacology*, **67**: 1229-1236.
- JACOB, S, RETT, K, WICKLMAYR, M, AGRAWAL, B, AUGUSTIN, HJ & DIETZE, GJ (1996). Differential effect of chronic treatment with two beta-blocking agents on insulin sensitivity: the carvedilol-metoprolol study. *J Hypertens*, **14**: 489-94.
- JAIN, M, LIM, CC, NAGATA, K, DAVIS, VM, MILSTONE, DS, LIAO, R & MORTENSEN, RM (2001). Targeted inactivation of Galpha(i) does not alter cardiac function or beta-adrenergic sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**: H569-75.
- JEAN-CHARLES, PY, RAJIV, V & SHENOY, SK (2016a). Ubiquitin-Related Roles of beta-Arrestins in Endocytic Trafficking and Signal Transduction. *J Cell Physiol*, **231**: 2071-80.
- JEAN-CHARLES, PY, ZHANG, L, WU, JH, HAN, SO, BRIAN, L, FREEDMAN, NJ & SHENOY, SK (2016b). Ubiquitin-specific Protease 20 Regulates the Reciprocal Functions of beta-Arrestin2 in Toll-like Receptor 4-promoted Nuclear Factor kappaB (NFkappaB) Activation. *J Biol Chem*, **291**: 7450-64.
- JONES, BW, SONG, GJ, GREUBER, EK & HINKLE, PM (2007). Phosphorylation of the endogenous thyrotropin-releasing hormone receptor in pituitary GH3 cells and pituitary tissue revealed by phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem*, **282**: 12893-906.
- JORNAYVAZ, FR & SHULMAN, GI (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*, **47**: 69-84.
- KARA, E, CREPIEUX, P, GAUTHIER, C, MARTINAT, N, PIKETTY, V, GUILLOU, F & REITER, E (2006). A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol Endocrinol*, **20**: 3014-26.
- KATZUNG, BG 2015. Basic&Clinical Pharmacology. In: BERTRAM G. KATZUNG, A. J. T. (ed.) *Basic&Clinical Pharmacology*. USA: McGraw-Hill Education s:218.
- KERBEY, AL, RANDLE, PJ, COOPER, RH, WHITEHOUSE, S, PASK, HT & DENTON, RM (1976). Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem J*, **154**: 327-48.
- KERNER, J & HOPPEL, C (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1486**: 1-17.

- KIM, IM, TILLEY, DG, CHEN, J, SALAZAR, NC, WHALEN, EJ, VIOLIN, JD & ROCKMAN, HA (2008). Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 14555-60.
- KIM, IM, WANG, Y, PARK, KM, TANG, Y, TEOH, JP, VINSON, J, TRAYNHAM, CJ, PIRONTI, G, MAO, L, SU, H, JOHNSON, JA, KOCH, WJ & ROCKMAN, HA (2014). beta-arrestin1-biased beta1-adrenergic receptor signaling regulates microRNA processing. *Circ Res*, **114**: 833-44.
- KING, KL, OKERE, IC, SHARMA, N, DYCK, JR, RESZKO, AE, MCELFRISH, TA, KERNER, J, CHANDLER, MP, LOPASCHUK, GD & STANLEY, WC (2005). Regulation of cardiac malonyl-CoA content and fatty acid oxidation during increased cardiac power. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**: H1033-7.
- KITESSA, SM & ABEYWARDENA, MY (2016). Lipid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle: The Chase for the Culprit Goes from Total Intramuscular Fat to Lipid Intermediates, and Finally to Species of Lipid Intermediates. *Nutrients*, **8**: 466.
- KOH, HJ (2016). Regulation of exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, **21**: 61-5.
- KOHOUT, TA, LIN, FS, PERRY, SJ, CONNER, DA & LEFKOWITZ, RJ (2001). beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 1601-6.
- KOMMADDI, RP & SHENOY, SK (2013). Arrestins and protein ubiquitination. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **118**: 175-204.
- KONG, G, PENN, R & BENOVIC, JL (1994). A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **269**: 13084-7.
- KOPECKY, SL (2006). Effect of beta blockers, particularly carvedilol, on reducing the risk of events after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, **98**: 1115-9.
- KUNST, G, KRESS, KR, GRUEN, M, UTTENWEILER, D, GAUTEL, M & FINK, RH (2000). Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res*, **86**: 51-8.
- LARSSON, NG, WANG, J, WILHELMSSON, H, OLDFORS, A, RUSTIN, P, LEWANDOSKI, M, BARSH, GS & CLAYTON, DA (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*, **18**: 231-6.
- LEE, MH, APPLETON, KM, STRUNGS, EG, KWON, JY, MORINELLI, TA, PETERSON, YK, LAPORTE, SA & LUTTRELL, LM (2016). The conformational signature of beta-arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature*, **531**: 665-8.
- LEFKOWITZ, RJ (2013). Arrestins come of age: a personal historical perspective. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **118**: 3-18.

- LEFKOWITZ, RJ & SHENOY, SK (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, **308**: 512-7.
- LEHMAN, JJ, BARGER, PM, KOVACS, A, SAFFITZ, JE, MEDEIROS, DM & KELLY, DP (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*, **106**: 847-56.
- LI, XB, GU, JD & ZHOU, QH (2015). Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thorac Cancer*, **6**: 17-24.
- LIM, S, LEE, KS, LEE, JE, PARK, HS, KIM, KM, MOON, JH, CHOI, SH, PARK, KS, KIM, YB & JANG, HC (2015). Effect of a new PPAR-gamma agonist, lobeglitazone, on neointimal formation after balloon injury in rats and the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **243**: 107-19.
- LIN, FT, KRUEGER, KM, KENDALL, HE, DAAKA, Y, FREDERICKS, ZL, PITCHER, JA & LEFKOWITZ, RJ (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem*, **272**: 31051-7.
- LISS, KH & FINCK, BN (2017). PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie*, **136**: 65-74.
- LITHELL, H, POLLARE, T & VESSBY, B (1992). Metabolic effects of pindolol and propranolol in a double-blind cross-over study in hypertensive patients. *Blood Press*, **1**: 92-101.
- LOBO, S & BERNLOHR, DA (2007). Fatty acid transport in adipocytes and the development of insulin resistance. *Novartis Found Symp*, **286**: 113-21.
- LOHSE, MJ, ENGELHARDT, S & ESCHENHAGEN, T (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*, **93**: 896-906.
- LOPASCHUK, GD (1989). Alterations in myocardial fatty acid metabolism contribute to ischemic injury in the diabetic. *Can J Cardiol*, **5**: 315-20.
- LOPASCHUK, GD (2002). Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Fail Rev*, **7**: 149-59.
- LOPASCHUK, GD, BELKE, DD, GAMBLE, J, ITOI, T & SCHONEKESS, BO (1994). Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, **1213**: 263-76.
- LOWELL, BB (1999). PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell*, **99**: 239-42.
- LOWELL, BB & SHULMAN, GI (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*, **307**: 384-7.
- LUAN, B, ZHAO, J, WU, H, DUAN, B, SHU, G, WANG, X, LI, D, JIA, W, KANG, J & PEI, G (2009). Deficiency of a beta-arrestin-2 signal complex contributes to insulin resistance. *Nature*, **457**: 1146-9.

- LUIKEN, JJ, COORT, SL, WILLEMS, J, COUMANS, WA, BONEN, A, VAN DER VUSSE, GJ & GLATZ, JF (2003). Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*, **52**: 1627-34.
- LUIKEN, JJ, KOONEN, DP, WILLEMS, J, ZORZANO, A, BECKER, C, FISCHER, Y, TANDON, NN, VAN DER VUSSE, GJ, BONEN, A & GLATZ, JF (2002). Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes*, **51**: 3113-9.
- LUO, J, BUSILLO, JM & BENOVIC, JL (2008). M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol*, **74**: 338-47.
- LUTTRELL, LM, FERGUSON, SS, DAAKA, Y, MILLER, WE, MAUDSLEY, S, DELLA ROCCA, GJ, LIN, F, KAWAKATSU, H, OWADA, K, LUTTRELL, DK, CARON, MG & LEFKOWITZ, RJ (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, **283**: 655-61.
- LUTTRELL, LM, ROUDABUSH, FL, CHOY, EW, MILLER, WE, FIELD, ME, PIERCE, KL & LEFKOWITZ, RJ (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 2449-54.
- LYMPEROPOULOS, A & BATHGATE, A (2013). Arrestins in the cardiovascular system. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **118**: 297-334.
- LYMPEROPOULOS, A, RENGO, G & KOCH, WJ (2012). GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new. *Curr Pharm Des*, **18**: 186-91.
- LYSIAK, W, TOTH, PP, SUELTER, CH & BIEBER, LL (1986). Quantitation of the efflux of acylcarnitines from rat heart, brain, and liver mitochondria. *J Biol Chem*, **261**: 13698-703.
- MARTSEVICH, S, KUTISHENKO, N, DEEV, A, OGANOV, R & SHALNOVA, S (2010). COMPARISON OF ANTYHYPERTENSIVE AND METABOLIC EFFECTS OF CARVEDILOL AND METAPROLOL IN HYPERTENSIVE PATIENTS WITH OVERWEIGHT AND OBESITY. CAMELLIA TRIAL.L: PP.34.365. *Journal of Hypertension*, **28**: e560.
- 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**: 365-76.
- MAZUMDER, PK, O'NEILL, BT, ROBERTS, MW, BUCHANAN, J, YUN, UJ, COOKSEY, RC, BOUDINA, S & ABEL, ED (2004). Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*, **53**: 2366-74.
- MCCRINK, KA, MANING, J, VU, A, JAFFERJEE, M, MARRERO, C, BRILL, A, BATHGATE-SIRYK, A, DABUL, S, KOCH, WJ & LYMPEROPOULOS, A (2017). beta-Arrestin2 Improves Post-Myocardial Infarction Heart Failure via Sarco(end)oplasmic Reticulum Ca(2+)-ATPase-Dependent Positive Inotropy in Cardiomyocytes. *Hypertension*, **70**: 972-981.



- MCCUDDEN, CR, HAINS, MD, KIMPLE, RJ, SIDEROVSKI, DP & WILLARD, FS (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*, **62**: 551-77.
- MCDONALD, PH, CHOW, CW, MILLER, WE, LAPORTE, SA, FIELD, ME, LIN, FT, DAVIS, RJ & LEFKOWITZ, RJ (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*, **290**: 1574-7.
- MCGILL, JB, BAKRIS, GL, FONSECA, V, RASKIN, P, MESSERLI, FH, PHILLIPS, RA, KATHOLI, RE, WRIGHT, JT, JR., IYENGAR, M, ANDERSON, KM, LUKAS, MA, DALAL, MR & BELL, DS (2007). beta-blocker use and diabetes symptom score: results from the GEMINI study. *Diabetes Obes Metab*, **9**: 408-17.
- MICHAEL, LF, WU, Z, CHEATHAM, RB, PUIGSERVER, P, ADELMANT, G, LEHMAN, JJ, KELLY, DP & SPIEGELMAN, BM (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 3820-5.
- MILLER, WE, MAUDSLEY, S, AHN, S, KHAN, KD, LUTTRELL, LM & LEFKOWITZ, RJ (2000). beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem*, **275**: 11312-9.
- MOOTHA, VK, LINDGREN, CM, ERIKSSON, KF, SUBRAMANIAN, A, SIHAG, S, LEHAR, J, PUIGSERVER, P, CARLSSON, E, RIDDERSTRALE, M, LAURILA, E, HOUSTIS, N, DALY, MJ, PATTERSON, N, MESIROV, JP, GOLUB, TR, TAMAYO, P, SPIEGELMAN, B, LANDER, ES, HIRSCHHORN, JN, ALTSHULER, D & GROOP, LC (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*, **34**: 267-73.
- MULLER, G (2000). Towards 3D structures of G protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach. *Curr Med Chem*, **7**: 861-88.
- NACCARELLI, GV & LUKAS, MA (2005). Carvedilol's antiarrhythmic properties: therapeutic implications in patients with left ventricular dysfunction. *Clin Cardiol*, **28**: 165-73.
- NAGA PRASAD, SV, DUAN, ZH, GUPTA, MK, SURAMPUDI, VS, VOLINIA, S, CALIN, GA, LIU, CG, KOTWAL, A, MORAVEC, CS, STARLING, RC, PEREZ, DM, SEN, S, WU, Q, PLOW, EF, CROCE, CM & KARNIK, S (2009). Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J Biol Chem*, **284**: 27487-99.
- NAGY, L, TONTONOZ, P, ALVAREZ, JG, CHEN, H & EVANS, RM (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, **93**: 229-40.
- NEELS, JG & GRIMALDI, PA (2014). Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Physiol Rev*, **94**: 795-858.
- NELSON, CD, PERRY, SJ, REGIER, DS, PRESCOTT, SM, TOPHAM, MK & LEFKOWITZ, RJ (2007). Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science*, **315**: 663-6.

- NOBLES, KN, XIAO, K, AHN, S, SHUKLA, AK, LAM, CM, RAJAGOPAL, S, STRACHAN, RT, HUANG, TY, BRESSLER, EA, HARA, MR, SHENOY, SK, GYGI, SP & LEFKOWITZ, RJ (2011). Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci Signal*, **4**: ra51.
- NOMA, T, LEMAIRE, A, NAGA PRASAD, SV, BARKI-HARRINGTON, L, TILLEY, DG, CHEN, J, LE CORVOISIER, P, VIOLIN, JD, WEI, H, LEFKOWITZ, RJ & ROCKMAN, HA (2007). Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest*, **117**: 2445-58.
- OAKLEY, RH, LAPORTE, SA, HOLT, JA, BARAK, LS & CARON, MG (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*, **274**: 32248-57.
- ONAY-BESIKCI, A, SUZMECELIK, E & OZCELIKAY, AT (2012). Carvedilol suppresses fatty acid oxidation and stimulates glycolysis in C2C12 cells. *Can J Physiol Pharmacol*, **90**: 1087-93.
- OVERINGTON, JP, AL-LAZIKANI, B & HOPKINS, AL (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, **5**: 993-6.
- PACKER, M, POOLE-WILSON, PA, ARMSTRONG, PW, CLELAND, JG, HOROWITZ, JD, MASSIE, BM, RYDEN, L, THYGESEN, K & URETSKY, BF (1999). Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group. *Circulation*, **100**: 2312-8.
- PAOLISSO, G, GAMBARDELLA, A, GALZERANO, D, DAMORE, A, RUBINO, P, VERZA, M, TEASURO, P, VARRICCHIO, M & DONOFRIO, F (1994). Total-Body and Myocardial Substrate Oxidation in Congestive-Heart-Failure. *Metabolism-Clinical and Experimental*, **43**: 174-179.
- PARK, KM, TEOH, JP, WANG, Y, BROSKOVA, Z, BAYOUMI, AS, TANG, Y, SU, H, WEINTRAUB, NL & KIM, IM (2016). Carvedilol-responsive microRNAs, miR-199a-3p and -214 protect cardiomyocytes from simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **311**: H371-83.
- PATEL, PA, TILLEY, DG & ROCKMAN, HA (2008). Beta-arrestin-mediated signaling in the heart. *Circ J*, **72**: 1725-9.
- PATTI, ME, BUTTE, AJ, CRUNKHORN, S, CUSI, K, BERRIA, R, KASHYAP, S, MIYAZAKI, Y, KOHANE, I, COSTELLO, M, SACCONI, R, LANDAKER, EJ, GOLDFINE, AB, MUN, E, DEFRONZO, R, FINLAYSON, J, KAHN, CR & MANDARINO, LJ (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 8466-71.
- PERRY, SJ, BAILLIE, GS, KOHOUT, TA, MCPHEE, I, MAGIERA, MM, ANG, KL, MILLER, WE, MCLEAN, AJ, CONTI, M, HOUSLAY, MD & LEFKOWITZ, RJ

- (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science*, **298**: 834-6.
- PETERS, JM, HENNUYER, N, STAELS, B, FRUCHART, JC, FIEVET, C, GONZALEZ, FJ & AUWERX, J (1997). Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem*, **272**: 27307-12.
- PETERSEN, KF, DUFOUR, S, BEFROY, D, GARCIA, R & SHULMAN, GI (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, **350**: 664-71.
- PETERSON, LR, WAGGONER, AD, SCHECHTMAN, KB, MEYER, T, GROPLER, RJ, BARZILAI, B & DAVILA-ROMAN, VG (2004). Alterations in left ventricular structure and function in young healthy obese women: assessment by echocardiography and tissue Doppler imaging. *J Am Coll Cardiol*, **43**: 1399-404.
- POLLARE, T, LITHELL, H, SELINUS, I & BERNE, C (1988). Application of prazosin is associated with an increase of insulin sensitivity in obese patients with hypertension. *Diabetologia*, **31**: 415-20.
- POLLARE, T, LITHELL, H, SELINUS, I & BERNE, C (1989). Sensitivity to insulin during treatment with atenolol and metoprolol: a randomised, double blind study of effects on carbohydrate and lipoprotein metabolism in hypertensive patients. *BMJ*, **298**: 1152-7.
- POOLE-WILSON, PA, SWEDBERG, K, CLELAND, JG, DI LENARDA, A, HANRATH, P, KOMAJDA, M, LUBSEN, J, LUTIGER, B, METRA, M, REMME, WJ, TORP-PEDERSEN, C, SCHERHAG, A, SKENE, A & CARVEDILOL OR METOPROLOL EUROPEAN TRIAL, I (2003). 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.
- POOLE, RC & HALESTRAP, AP (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol*, **264**: C761-82.
- POORNIMA, IG, PARIKH, P & SHANNON, RP (2006). Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res*, **98**: 596-605.
- POVSIC, TJ, KOHOUT, TA & LEFKOWITZ, RJ (2003). Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J Biol Chem*, **278**: 51334-9.
- PRICHARD, BN (1964). Hypotensive Action of Pronethalol. *Br Med J*, **1**: 1227-8.
- PRICHARD, BN (1978). The second Lilly Prize Lecture, University of Newcastle, July 1977. beta-Adrenergic receptor blockade in hypertension, past, present and future. *Br J Clin Pharmacol*, **5**: 379-99.
- PRICHARD, BN & GILLAM, PM (1964). Use of Propranolol (Inderal) in Treatment of Hypertension. *Br Med J*, **2**: 725-7.

- PUIGSERVER, P, WU, Z, PARK, CW, GRAVES, R, WRIGHT, M & SPIEGELMAN, BM (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, **92**: 829-39.
- RAHMEH, R, DAMIAN, M, COTTET, M, ORCEL, H, MENDRE, C, DURROUX, T, SHARMA, KS, DURAND, G, PUCCI, B, TRINQUET, E, ZWIER, JM, DEUPI, X, BRON, P, BANERES, JL, MOUILLAC, B & GRANIER, S (2012). Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 6733-8.
- RAJAGOPAL, K, WHALEN, EJ, VIOLIN, JD, STIBER, JA, ROSENBERG, PB, PREMONT, RT, COFFMAN, TM, ROCKMAN, HA & LEFKOWITZ, RJ (2006). Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 16284-9.
- RAKESH, K, YOO, B, KIM, IM, SALAZAR, N, KIM, KS & ROCKMAN, HA (2010). beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci Signal*, **3**: ra46.
- RAKSHSHANDEHROO, M, KNOCH, B, MULLER, M & KERSTEN, S (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res*, **61**:393–416.
- RANDLE, PJ (1986). Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans*, **14**: 799-806.
- RANDLE, PJ, GARLAND, PB, HALES, CN & NEWSHOLME, EA (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, **1**: 785-9.
- RANKOVIC, Z, BRUST, TF & BOHN, LM (2016). Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*, **26**: 241-250.
- REITER, E, AHN, S, SHUKLA, AK & LEFKOWITZ, RJ (2012). Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **52**: 179-97.
- ROBERGS, RA, GHIASVAND, F & PARKER, D (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **287**: R502-16.
- RODRIGUES, B, CAM, MC & MCNEILL, JH (1995). Myocardial substrate metabolism: implications for diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, **27**: 169-79.
- RYALL, JG, CHURCH, JE & LYNCH, GS (2010). Novel role for ss-adrenergic signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **37**: 397-401.
- SACK, MN, DISCH, DL, ROCKMAN, HA & KELLY, DP (1997). A role for Sp and nuclear receptor transcription factors in a cardiac hypertrophic growth program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 6438-43.
- SAITO, F, KAWAGUCHI, M, IZUMIDA, J, ASAKURA, T, MAEHARA, K & MARUYAMA, Y (2003). Alteration in haemodynamics and pathological changes in the cardiovascular system during the development of Type 2 diabetes mellitus in OLETF rats. *Diabetologia*, **46**: 1161-9.

- SALWAY, JG 1999. *Metabolism at a Glance*, Oxford, Blackwell Science, s:11.
- SAMUEL, VT & SHULMAN, GI (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*, **126**: 12-22.
- SAMUELSSON, O, HEDNER, T, BERGLUND, G, PERSSON, B, ANDERSSON, OK & WILHELMSEN, L (1994). 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 Goteborg, Sweden. *J Hum Hypertens*, **8**: 257-63.
- SANO, M, WANG, SC, SHIRAI, M, SCAGLIA, F, XIE, M, SAKAI, S, TANAKA, T, KULKARNI, PA, BARGER, PM, YOUKER, KA, TAFFET, GE, HAMAMORI, Y, MICHAEL, LH, CRAIGEN, WJ & SCHNEIDER, MD (2004). Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J*, **23**: 3559-69.
- SCARPULLA, RC (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1576**: 1-14.
- SCHONEKESS, BO (1997). Competition between lactate and fatty acids as sources of ATP in the isolated working rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, **29**: 2725-33.
- SEVERSON, DL (2004). Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, **82**: 813-23.
- SHENOY, SK, DRAKE, MT, NELSON, CD, HOUTZ, DA, XIAO, K, MADABUSHI, S, REITER, E, PREMONT, RT, LICHTARGE, O & LEFKOWITZ, RJ (2006). beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **281**: 1261-73.
- SHENOY, SK & LEFKOWITZ, RJ (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J*, **375**: 503-15.
- SHENOY, SK & LEFKOWITZ, RJ (2011). beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*, **32**: 521-33.
- SHUKLA, AK, XIAO, K & LEFKOWITZ, RJ (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci*, **36**: 457-69.
- SIMMERMAN, HK & JONES, LR (1998). Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev*, **78**: 921-47.
- SIVITZ, WI & YOREK, MA (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, **12**: 537-77.
- SONODA, N, IMAMURA, T, YOSHIKAWA, T, BABENDURE, JL, LU, JC & OLEFSKY, JM (2008). Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 6614-9.

- STANLEY, WC, LOPASCHUK, GD & MCCORMACK, JG (1997). Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res*, **34**: 25-33.
- STANLEY, WC, RECCHIA, FA & LOPASCHUK, GD (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, **85**: 1093-129.
- STRNISKOVA, M, BARANCIK, M, NECKAR, J & RAVINGEROVA, T (2003). Mitogen-activated protein kinases in the acute diabetic myocardium. *Mol Cell Biochem*, **249**: 59-65.
- SU, CG, WEN, X, BAILEY, ST, JIANG, W, RANGWALA, SM, KEILBAUGH, SA, FLANIGAN, A, MURTHY, S, LAZAR, MA & WU, GD (1999). A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*, **104**: 383-9.
- SULAKHE, PV & VO, XT (1995). Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem*, **149-150**: 103-26.
- SUNDEGREN, NC, GIRAUD, GD, SCHULTZ, JM, LASAREV, MR, STORK, PJ & THORNBURG, KL (2003). Extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositol-3 kinase mediate IGF-1 induced proliferation of fetal sheep cardiomyocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**: R1481-9.
- TAEGETMEYER, H, MCNULTY, P & YOUNG, ME (2002). Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation*, **105**: 1727-33.
- TANG, Y, WANG, Y, PARK, KM, HU, Q, TEOH, JP, BROSKOVA, Z, RANGANATHAN, P, JAYAKUMAR, C, LI, J, SU, H, TANG, Y, RAMESH, G & KIM, IM (2015). MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. *Cardiovasc Res*, **106**: 387-97.
- TARIGOPULA, M, DAVIS, RT, 3RD, MUNGAI, PT, RYBA, DM, WIECZOREK, DF, COWAN, CL, VIOLIN, JD, WOLSKA, BM & SOLARO, RJ (2015). Cardiac myosin light chain phosphorylation and inotropic effects of a biased ligand, TRV120023, in a dilated cardiomyopathy model. *Cardiovasc Res*, **107**: 226-34.
- TEOH, JP, BAYOUMI, AS, AONUMA, T, XU, Y, JOHNSON, JA, SU, H, WEINTRAUB, NL, TANG, Y & KIM, IM (2018). beta-arrestin-biased agonism of beta-adrenergic receptor regulates Dicer-mediated microRNA maturation to promote cardioprotective signaling. *J Mol Cell Cardiol*, **118**: 225-236.
- TESLAA, T & TEITELL, MA (2014). Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol*, **542**: 91-114.
- TORP-PEDERSEN, C, METRA, M, CHARLESWORTH, A, SPARK, P, LUKAS, MA, POOLE-WILSON, PA, SWEDBERG, K, CLELAND, JG, DI LENARDA, A, REMME, WJ, SCHERHAG, A & INVESTIGATORS, C (2007). Effects of metoprolol and carvedilol on pre-existing and new onset diabetes in patients with chronic heart failure: data from the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET). *Heart*, **93**: 968-73.

- TORP-PEDERSEN, C, POOLE-WILSON, PA, SWEDBERG, K, CLELAND, JG, DI LENARDA, A, HANRATH, P, KOMAJDA, M, LUTIGER, B, METRA, M, REMME, WJ, SCHERHAG, A, SKENE, A & INVESTIGATORS, C (2005). Effects of metoprolol and carvedilol on cause-specific mortality and morbidity in patients with chronic heart failure--COMET. *Am Heart J*, **149**: 370-6.
- VAN NIEUWENHOVEN, FA, LUIKEN, JJ, DE JONG, YF, GRIMALDI, PA, VAN DER VUSSE, GJ & GLATZ, JF (1998). Stable transfection of fatty acid translocase (CD36) in a rat heart muscle cell line (H9c2). *J Lipid Res*, **39**: 2039-47.
- VAN NIEUWENHOVEN, FA, VERSTIJNEN, CP, ABUMRAD, NA, WILLEMSSEN, PH, VAN EYS, GJ, VAN DER VUSSE, GJ & GLATZ, JF (1995). Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun*, **207**: 747-52.
- VAN RAALTE, DH, LI, M, PRITCHARD, PH & WASAN, KM (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. *Pharm Res*, **21**: 1531-8.
- VIOLIN, JD, DEWIRE, SM, YAMASHITA, D, ROMINGER, DH, NGUYEN, L, SCHILLER, K, WHALEN, EJ, GOWEN, M & LARK, MW (2010). Selectively Engaging beta-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **335**: 572-579.
- VIOLIN, JD & LEFKOWITZ, RJ (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **28**: 416-22.
- WANG, J, HANADA, K, STAUS, DP, MAKARA, MA, DAHAL, GR, CHEN, Q, AHLES, A, ENGELHARDT, S & ROCKMAN, HA (2017a). Galphai is required for carvedilol-induced beta1 adrenergic receptor beta-arrestin biased signaling. *Nat Commun*, **8**: 1706.
- WANG, Q, LIU, Y, FU, Q, XU, B, ZHANG, Y, KIM, S, TAN, R, BARBAGALLO, F, WEST, T, ANDERSON, E, WEI, W, ABEL, ED & XIANG, YK (2017b). Inhibiting Insulin-Mediated beta2-Adrenergic Receptor Activation Prevents Diabetes-Associated Cardiac Dysfunction. *Circulation*, **135**: 73-88.
- WHITEHOUSE, S, COOPER, RH & RANDLE, PJ (1974). Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids. *Biochem J*, **141**: 761-74.
- WILSON-FRITCH, L, BURKART, A, BELL, G, MENDELSON, K, LESZYK, J, NICOLORO, S, CZECH, M & CORVERA, S (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*, **23**: 1085-94.
- WILSON-FRITCH, L, NICOLORO, S, CHOUINARD, M, LAZAR, MA, CHUI, PC, LESZYK, J, STRAUBHAAR, J, CZECH, MP & CORVERA, S (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*, **114**: 1281-9.

- WISLER, JW, DEWIRE, SM, WHALEN, EJ, VIOLIN, JD, DRAKE, MT, AHN, S, SHENOY, SK & LEFKOWITZ, RJ (2007). A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 16657-62.
- WU, Z, PUIGSERVER, P, ANDERSSON, U, ZHANG, C, ADELMANT, G, MOOTHA, V, TROY, A, CINTI, S, LOWELL, B, SCARPULLA, RC & SPIEGELMAN, BM (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, **98**: 115-24.
- YANG, J, SAMBANDAM, N, HAN, X, GROSS, RW, COURTOIS, M, KOVACS, A, FEBBRAIO, M, FINCK, BN & KELLY, DP (2007). CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res*, **100**: 1208-17.
- YAO, K, ZHANG, WW, YAO, L, YANG, S, NIE, W & HUANG, F (2016). Carvedilol promotes mitochondrial biogenesis by regulating the PGC-1/TFAM pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Biochem Biophys Res Commun*, **470**: 961-6.
- YOON, JC, PUIGSERVER, P, CHEN, G, DONOVAN, J, WU, Z, RHEE, J, ADELMANT, G, STAFFORD, J, KAHN, CR, GRANNER, DK, NEWGARD, CB & SPIEGELMAN, BM (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, **413**: 131-8.
- YOUNG, ME, MCNULTY, P & TAEGTMEYER, H (2002). Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. *Circulation*, **105**: 1861-70.
- YUE, TL, CHENG, HY, LYSKO, PG, MCKENNA, PJ, FEUERSTEIN, R, GU, JL, LYSKO, KA, DAVIS, LL & FEUERSTEIN, G (1992). Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J Pharmacol Exp Ther*, **263**: 92-8.
- ZHANG, ZY, ZHOU, B & XIE, L (2002). Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther*, **93**: 307-17.
- ZHAO, XL, GUTIERREZ, LM, CHANG, CF & HOSEY, MM (1994). The alpha 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**: 166-73.
- ZHUANG, LN, HU, WX, XIN, SM, ZHAO, J & PEI, G (2011a). Beta-arrestin-1 protein represses adipogenesis and inflammatory responses through its interaction with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma). *J Biol Chem*, **286**: 28403-13.
- ZHUANG, LN, HU, WX, ZHANG, ML, XIN, SM, JIA, WP, ZHAO, J & PEI, G (2011b). Beta-arrestin-1 protein represses diet-induced obesity. *J Biol Chem*, **286**: 28396-402.
- ZIDAR, DA, VIOLIN, JD, WHALEN, EJ & LEFKOWITZ, RJ (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: 9649-54.



ZWERSCHKE, W, MAZUREK, S, STOCKL, P, HUTTER, E, EIGENBRODT, E & JANSEN-DURR, P (2003). Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem J*, **376**: 403-11.



## EKLER

### Ek.1. Etik Kurul Onay Raporu



T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 19/10/2016  
TOPLANTI NO : 2016-20  
DOSYA NO : 2016-117  
KARAR NO : 2016-20-173

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Arzu Onay Beşikçi'nin yaptığı, araştırmacı olarak Doç.Dr.Ebru Arnoğlu İnan, Dr.Gizem Kaykı Mutlu, Arş.Gör.Berna Güven ve Ecz.Zümra Kara'nın katıldığı "Karvedilolün Metabolik ve Kardiyovasküler Etkilerine Beta Arrestinlerin Katkısının İncelenmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiştir. Araştırma yürütücüsü tarafından, Kurulumuzun 21/09/2016 tarihli toplantısında alınan 2016-18-163 sayılı kararı uyarınca düzeltilmiş olan söz konusu çalışmanın Üniversite senatosununun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sığan  
Hayvan Sayısı : 76  
Geçerlilik Süresi : 01/06/2017-01/02/2020

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	-
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks : 0 (312) 212 60 49

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

**Adı:** Berna  
**Soyadı:** GÜVEN  
**Doğum yeri ve tarihi:** Araklı,1989  
**Uyruğu:** T.C.  
**Medeni durumu:** Bekar  
**İletişim adresi ve telefonu:** Define sk. 16/7 Aydınlikevler, ANKARA  
+905468723661

### II- Eğitimi

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2008-2013)

Yabancı dili: İngilizce

### III- Ünvanları

Araştırma Görevlisi

### IV- Mesleki deneyimi

2014-halen Araştırma Görevlisi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmakoloji Anabilim Dalı

### V- Üye olduğu bilimsel kuruluşlar

Türk Farmakoloji Derneği

## VI- Bilimsel İlgi Alanları

### Yayınları:

#### Makaleler

1. Demirel S, Ayhan Kılıçgil G, Kara Z, **Güven B**, Onay-Besikci A. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Some Benzimidazole Acetohydrazide Derivatives as EGFR Inhibitors, Turk J Pharm Sci, 14 (3), 285-289, 2017.
2. Celik İ, Ayhan-Kılıçgil G, **Güven B**, Kara Z, Gurkan-Alp AS, Karayel A, Onay-Besikci A. Design, synthesis and docking studies of benzimidazole derivatives as potential EGFR inhibitors. Eur J Med Chem, 173:240-249, 2019.

#### Bildiriler

1. Kara Z, **Güven B.**, Onay-Besikci A. Investigation of the Pleiotropic Vascular Effects of Ivabradine in Control and Diabetic Rats, 20th Annual Meeting of European Council for Cardiovascular Research, ECCR, October 14-16, 2016, Lake Garda, Poiano, Italy.
2. Çelik İ, Kılıçgil G, Kara Z, **Güven B**, Besikci A. Synthesis of Some 1H-Benzimidazoles Containing Cyclohexyl Substituted Thiosemicarbazides, Triazoles, Thiadiazoles as Inhibitors of EGFR Tyrosine Kinase. GPSS2017, October 11-13, 2017.
3. Kara Z, **Güven B**, Onay-Besikci A. The Mechanism of Acute and Chronic Vascular Effects of Ivabradine in Control and Diabetic Rats. Frontiers in CardioVascular Biology 2018, April 20-22, 2018, Vienna, Austria.
4. **Güven B**, Kara Z, Onay-Besikci A. Therapeutic effect of Carvedilol on Cardiac Function in Streptozotocin-Diabetic Rats. Frontiers in CardioVascular Biology 2018, April 20-22, 2018, Vienna, Austria.
5. Yılmaz D, Kara Z, **Güven B**, Beşikci A, Gür S. The Possible Beneficial Effect of Ivabradine Treatment on Erectile Tissue in a Diabetic Rat Model. ISOPS 12th , June 26-29, 2018, Ankara, Turkey.

6. Yılmaz D, **Guven B**, Kara Z, Gür S, Beşikci A. The Effect of Carvedilol Treatment on Erectile Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. ISOPS 12th June 26-29, 2018, Ankara, Turkey.
7. Kara Z, **Guven B**, Onay-Besikci A. Presence of HCN Channels in Rat Aorta and Prevention of Endothelial Dysfunction with Their Selective Inhibitor Ivabradine. Pharmacology 2018, December 18-20, 2018, London, UK.
8. **Guven B**, Kara Z, Onay-Besikci A. Metabolic Effects of Carvedilol Through  $\beta$ -arrestin-2: Investigations in Cells and Streptozotocin-Diabetic Rats. SHVM 17th Annual Scientific Sessions, June 23-26, 2019, Amsterdam, The Netherlands.

## **VII- Bilimsel Etkinlikleri**

**Aldığı Burslar:** 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı (TÜBİTAK)

**Projeler:** **2018-2019 TÜBİTAK, Proje numarası: 217S961** *Bir Biased Agonist Olarak Karvedilol: Metabolik Sonuçlar Ve Mitokondriyel Biyojenezin Hücre Dizilerinde Değerlendirilmesi, Araştırmacı.*

## **VIII-Diğer Bilgiler**

### **Katıldığı Eğitim Seminerleri:**

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası Eğitim Programı

Eğiticilerin Eğitimi Sertifika Programı

### **Bilimsel Toplantılar**

11. International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS)- Sosyal Komite