



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BETA ADRENERJİK RESEPTÖR BLOKERİ İLAÇLARIN
KALBİN SUBSTRAT METABOLİZMASI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
MİYOSİT HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ**

Elif SÜZMEÇELİK

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr.Arzu ONAY BEŞİKÇİ**

2011- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BETA ADRENERJİK RESEPTÖR BLOKERİ İLAÇLARIN
KALBİN SUBSTRAT METABOLİZMASI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
MİYOSİT HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ**

Elif SÜZMEÇELİK

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Arzu ONAY BEŞİKCİ**

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Müdürlüğü tarafından 09H3336001 proje numarası ve TÜBİTAK tarafından SBAG-HD-299 proje numarası ile desteklenmiştir.

2011-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/02/2011

Prof. Dr. Nuray ARI
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Doç. Dr. Arzu ONAY BEŞİKÇİ
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Danışman

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Mustafa ARK
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	V
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller	VII
Çizelgeler	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Metabolizma ve Enerji	1
1.2. Kalp Metabolizması ve Enerji	3
1.2.1. Karbohidrat metabolizması	5
1.2.1.1. Glukoz metabolizması	6
1.2.1.2. Glikoliz ve glukoz oksidasyonu	6
1.2.2. Yağ asidi metabolizması	12
1.2.2.1. Beta-oksidasyon (β -oksidasyon)	12
1.2.2.2. Kalpte yağ asidi metabolizması ve regülasyonu	15
1.2.3. Miyokard substrat metabolizması ve regülasyonu	18
1.2.4. Substrat seçiminin önemi	21
1.3. β -blokerler	22
1.3.1. β -blokerler ve metabolizma	23
1.3.2. Karvedilol ve olası metabolik etkileri	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Kullanılan araç ve gereçler	27
2.1.1. Malzemeler	27
2.1.2. Kimyasal maddeler	28
2.1.3. Hücreler	29
2.2. Kullanılan yöntemler	29
2.2.1. Hücre kültürü	29
2.2.1.1. Hücrelerin çoğaltılması	29
2.2.1.2. Hücrelerin bölünmesi (pasajlama)	30
2.2.1.3. Hücrelerin deneye hazırlanması	30

2.2.1.4. Validasyon	31
2.2.1.5. Sterilizasyon	31
2.2.2. Glikoliz	32
2.2.3. Glukoz oksidasyonu	33
2.2.4. Palmitik asit oksidasyonu	34
2.2.5. Adrenalinle stimülasyon	35
2.2.6. Bradford protein miktar tayini	35
2.2.7. İstatistiksel analiz	36
3. BULGULAR	37
3.1. Validasyon	37
3.2. Hücrelerin miyotüp formuna dönüştürülmesi (<i>Differentiation</i>)	37
3.3. Dinlenme halindeki hücrelerde gerçekleştirilen deneyler	37
3.4. Glikoliz hızı	38
3.4.1. Karvedilol ile glikoliz hızı deneyi	38
3.4.2. Adrenalin varlığında glikoliz hızı deneyi	39
3.5. Glukoz oksidasyonu hızı	40
3.6. Palmitik asit oksidasyonu hızı	41
3.6.1. AICAR ile palmitik asit oksidasyonu hızının indüklenmesi	41
3.6.2. Karvedilol, bisoprolol ve propranolol için palmitik asit oksidasyonu hızlarının karşılaştırılması	42
3.6.3. Adrenalin stimülasyonu varlığında palmitik asit oksidasyonu	43
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
ÖZET	48
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	57

ÖNSÖZ

Tez çalışmasında çeşitli beta blokerlerin metabolizma üzerindeki etkileri miyosit hücre kültüründe karşılaştırılmış; ölçümler, sempatik aktiviteyi taklit etmek amacıyla bir kez de adrenalin varlığında tekrar edilmiştir. Karvedilolün olumlu metabolik etkilerinin hangi reseptörler üzerinden ve nasıl gerçekleştiği incelenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince önümde yepyeni ufuklar açan, hayal bile edemeyeceğim şeyleri gerçeğe dönüştüren ve hem mesleğime hem de hayata dair çok şey öğrendiğim değerli hocam Doç. Dr. Arzu Onay Beşikci'ye;

Zor zamanlarımda hiç çekinmeden yardımlarına başvurduğum, Dr. Ali Murat İrat'a ve sevgili hocam Prof. Dr. Nuray Arı'ya; desteğini hiç esirgemeyen Uzm. Ecz. Işıl Özakça'ya;

Tezin hazırlanmasında en az benim kadar yorulan, sevgili dostum Süleyman Engin Yılmaz'a

Ve burada adını sayamadığım, emeği geçen herkese BİNLERCE TEŞEKKÜRLER...

Vorrei esprimere la mia gratitudine a Prof. Emilio Macchi, Prof.ssa Silvana Baruffi e carissimo Dott. Stefano Rossi. Siete sempre nel mio cuore...

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin Difosfat
AICAR	Aminoimidazol Karboksamid Ribonükleotid
AKK	Asetil-KoA Karboksilaz
AMP	Adenozin Monofosfat
AMPK	AMP-aktive Protein Kinaz
ATP	Adenozin Trifosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Serum
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FBS	Fetal Bovine Serum
FFK-I	Fosfofruktokinaz I
FFK-II	Fosfofruktokinaz II
GLUT	Glukoz Taşıyıcısı
KAT-I	Karnitin Açıl Transferaz I
KAT-II	Karnitin Açıl Transferaz II
KKY	Konjestif Kalp Yetmezliği
MKD	Malonil-KoA Dekarboksilaz
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDH	Piruvat Dehidrojenaz
PDK	Piruvat Dehidrojenaz Kinaz
TCA	Trikarboksilik Asit
YABP	Yağ Asidi Bağlayıcı Protein

ŞEKİLLER

Şekil 1.1	Metabolik yakıtlar ve enerji eldesi	2
Şekil 1.2	Glikoliz reaksiyonları	8
Şekil 1.3	Piruvat metabolizması	11
Şekil 1.4	Mitokondri içine yağ asidi taşınması	13
Şekil 1.5	Substratların hücre içinde izledikleri yollar	19
Şekil 2.1	Hücrelerin çoğaltıldığı flasklar (sol tarafta) ve %10'luk ortamdaki hücrelerin görünüşü (sağ tarafta)	30
Şekil 2.2	%1'lik ortamda gerçekleşen miyotüp oluşumu	31
Şekil 3.1	$10^{-6}M$, $10^{-5}M$ ve $10^{-4}M$ konsantrasyonlarda karvedilol ile glikoliz hızı ölçümü deneyi sonuçları	38
Şekil 3.2	α -bloker, β -bloker varlığında ve adrenalin stimülasyonu ile glikoliz hızındaki değişiklikler	39
Şekil 3.3	Karvedilol varlığında glukoz oksidasyonu hızı	40
Şekil 3.4	AICAR eklenerek indüklenen yağ asidi oksidasyonu	41
Şekil 3.5	Karvedilol, bisoprolol ve propranolol için palmitik asit oksidasyonu hızları	42
Şekil 3.6	α -bloker, β -bloker varlığında ve adrenalin stimülasyonu ile palmitik asit oksidasyonu hızındaki değişiklikler	43

ÇİZELGELER

Çizelge 1. □	Miyokard tarafından seçilen substratın üretilen ATP/tüketilen oksijen oranına etkisi	22
--------------	--------------------------------------------------------------------------------------	----

1. GİRİŞ

Beta adrenerjik reseptör blokeri ilaçlar (β -blokerler) çeşitli endikasyonlar ile çok yaygın kullanılan bir ilaç grubudur. Vücutta çeşitli dokularda değişik alt tipleri olan β -adrenerjik reseptörler üzerinden etkilerini gösterirler ve yalnızca β - adrenerjik reseptör alt tiplerine değil, aynı zamanda α -adrenerjik reseptör alt tiplerine de blokaj yapabilirler. Bu grup ilaçlar, başta kontrendike kabul edilmesine rağmen günümüzde kalp yetmezliği tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda gerçekleştirilmiş, çeşitli β -blokerleri birbiriyle karşılaştıran çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, karvedilol, β -blokerler arasında dokularda insülin rezistansı veya diyabet riski oluşturmayan tek ilaçtır.

Kalp yetmezliği tablosunda çeşitli metabolik değişikliklerin gerçekleştiği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Metabolik tabloda olumlu değişiklikler yaptığı bilinen karvedilolün, kalp yetmezliği durumunda bu etkisini α -adrenerjik reseptörler üzerinden göstermesi olasıdır.

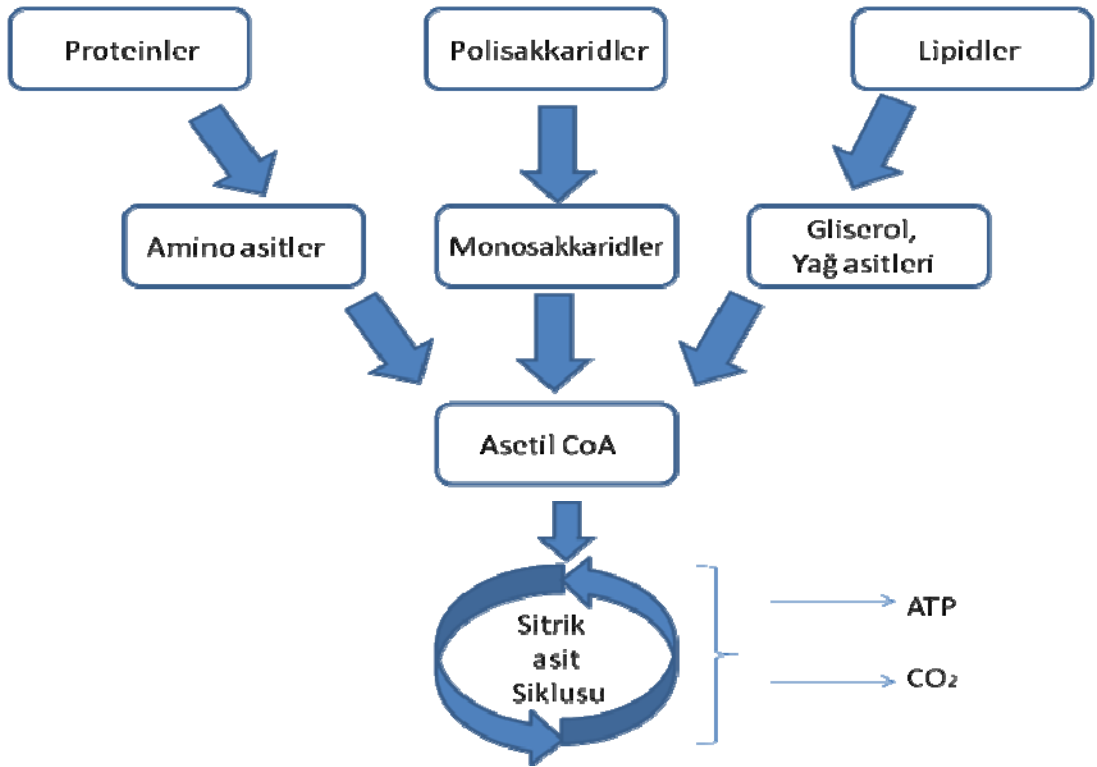
Tez çalışmasında, miyosit hücre kültüründe karvedilol başka β -bloker ilaçlar ile karşılaştırılarak, metabolik yollarda kullanılan substratlar incelenmiş; ayrıca çalışmalar adrenalın varlığında tekrar edilerek kalp yetmezliği tablosundaki gözlemlenen aşırı sempatik sinir sistemi aktivasyonu taklit edilerek sonuçlar tekrar değerlendirilmiştir.

1.1. Metabolizma ve Enerji

Metabolizma, organizmada canlılığın devamının sağlanması ve yaşamın sürdürülebilmesi için gerçekleşen; bir reaksiyon ürününün, takip eden basamağın substratı olduğu, ardışık basamaklardan oluşan karmaşık kimyasal reaksiyonlar ağıdır.

Tüm organların ve organ sistemlerinin işlevlerini yerine getirmeleri için temel ihtiyaç enerjidir ve bu ihtiyacın devamlı olarak karşılanabilmesi için enerji, organizmada çeşitli formlarda depolanmış halde saklanır. En temel depolama şekillerinden biri de, 3 fosfat molekülünün, 1 adenzin molekülü ile birleşmesi sonucu açığa çıkan adenzin trifosfattır (ATP).

Organizmada metabolik işlevlerin devamı için gereken enerji eldesi genellikle büyük moleküllerin yıkım reaksiyonları üzerinden yürür. Büyük moleküllerin, yapı taşlarına ayrılması ve sonrasında bu yapıtaşlarının asetil koenzim A (asetil-KoA) moleküllerine parçalanıp, trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katılması sonucu ATP formunda enerji elde edilir (Harper'ın Biyokimyası, 24. Baskı, sf. 166-169).



Şekil-1.1. Metabolik yakıtlar ve enerji eldesi

En yaygın enerji deposu formlarından biri olan ATP; “adenozintrifosfataz” adlı enzimle hidrolize uğrar, her seferinde koparılan bir fosfat bağından açığa çıkan enerji organizmada gerekli işlevlerin yerine getirilmesinde kullanılır.

1.2. Kalp Metabolizması ve Enerji

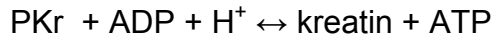
Her organın ya da dokunun işlevini yerine getirebilmesi için ATP formunda enerjiye ihtiyacı vardır. Ancak, kalp, yerine getirdiği fonksiyonların gerektirdiği doğrultuda enerji ihtiyacı çok yüksek olan bir organdır. Kasılma, gevşeme, pompalama gibi mekanik işlevlerin yanı sıra, çeşitli moleküler sentez ve yıkımlar veya eksitasyon gibi biyolojik fonksiyonlar için çok miktarda enerjiye ihtiyaç duyar. Vücuda gereken oksijeni sunmak için damar içi dirence karşı, kanı, aort ve akciğer arterine pompalamak üzere kimyasal enerjiyi mekanik işlere dönüştürür. Durmaksızın attığı için, kesintisiz ve çok miktarda enerjiye ihtiyacı vardır, bu nedenle normal koşullar altında bile enerji ve oksijen sağlanması ancak “sınırdan” yeterli gelmektedir (Ingwall ve Weiss, 2004).

Ancak, kalbin enerjetik durumu basitçe, var olan ATP konsantrasyonu üzerinden tanımlanamaz; nitekim, dakika başına üretilen ve kullanılan ATP miktarı, var olan sabit ATP havuzunun konsantrasyondan çok daha fazladır. Bu noktada kalbin performansı için yeterli ve devamlı ATP sağlanması çok daha kritik önem kazanmaktadır.

ATP'ye gerek duyulan reaksiyonlar, aynı zamanda ATP'nin yıkımıyla açığa çıkan adenosin difosfat (ADP) ve organik fosfat (P_i) varlığına da bağlıdır. Bu nedenle ATP'nin yıkım ürünlerinin konsantrasyonları da önemlidir. $[ATP]/[ADP][P_i]$ oranı; yani fosforilasyon potansiyeli (FP), ATP ihtiyacı duyulan reaksiyonlar için ATP'nin hidrolizinden açığa çıkacak enerjiyi belirler. İntrasellüler [ATP], [ADP], [P_i] ve FP normal ventriküler dokuda,

sırasıyla; ~10 mmol/L, <50 µmol/L, <1 mmol/L ve >200 mmol/L'dir (Ingwall ve Weiss, 2004).

Kalpteki birincil enerji rezervi fosfokreatinin (PKr) şeklinde yedeklenmiştir ve ATP'nin 2 katı konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Kreatinin kinaz (KK) enzimiyle; ATP ile PKr arasındaki fosforil grubu transferi, oksidatif fosforilasyon yolağı üzerinden ATP sentezinden 10 kat daha hızlı gerçekleşir:



İskemi nedeniyle akut ya da kronik pompalama yetersizliği gibi durumlarda ATP talebi mevcut miktarı aşar. Bu gibi durumlarda, kreatin üzerinden ATP eldesi, kalbe enerji sağlanmasının sürekliliği açısından çok önemlidir. KK reaksiyonu, aynı zamanda [ADP] ve [P_i] konsantrasyonlarının da düşük kalmasını sağlayarak, fosforilasyon potansiyelinin en yüksek durumda bulunmasına yardım eder.

Adenilat kinaz (AK) enzimi de, adenin nükleotitleri arasında fosforil gruplarının transfer edilmesi mekanizması üzerinden yüksek konsantrasyonlarda ATP sağlamak için çalışır:



Glikojen ise indirekt bir enerji deposudur; glikozil birimleri, glikolitik ve oksidatif yollar üzerinden ATP eldesinde kullanılır. Serbest yağ asitleri de, gerektiğinde enerji eldesinde kullanılmak üzere adiposit hücrelerinde trigliserit şeklinde depolanır.

Biyopsi örneklerinin analizlerine göre yetmezlik durumundaki kalpte ATP konsantrasyonu yaklaşık olarak %25-30 arasında düşmektedir. Yapılan araştırmalar düşüşün yavaş bir ilerleme kaydettiğini göstermiştir. (~ %0.35 /

gün) Bu değer de, durumun ciddi boyutlara varmadan fark edilmesinin kolay olmadığını ve literatürde neden farklı bulgulara ulaşıldığını göstermektedir (Ingwall ve Weiss, 2004).

Kalp yetmezliği olan hayvan modellerindeki çalışmalar, ATP kaybının, total adenin nükleotitleri (TAN) havuzundaki kayıptan kaynaklandığını gösteriyor. ATP sentezi ile yıkımı arasında süregelen dengesizlik ise, daha fazla ATP ve TAN kaybı ile sonuçlanmakta ve kalbin ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlaması daha da zorlaşmaktadır (Ingwall ve Weiss, 2004).

1.2.1. Karbohidrat metabolizması

Karbohidrat metabolizması en geniş anlatımıyla glikoliz, glukoz oksidasyonu ve laktat oksidasyonu gibi aerobik ve anaerobik koşullarda gerçekleşebilen reaksiyonlar zincirini ifade etmektedir.

Metabolik reaksiyonları katalizleyen enzimler, substratları uygun enzimlere yönlendirecek veya enerji tüketen yapıların yanında ATP salımını gerçekleştirecek şekilde sitoskeleton tarafından organize edilmektedir. Enzimlerden daha küçük moleküller olan koenzimler, glikolizde ve diğer metabolik yollarda çok önemli role sahiptirler. Çoğu aynı zamanda vücut için esansiyeldir. Çeşitli koenzimler indirgeme reaksiyonlarına katılır. Okside haldeyken çeşitli reaksiyonlardan gelen elektronları kabul ederek indirgenirler, sonrasında ise mitokondride yeniden okside formlarına dönüşerek ATP üretimini sağlarlar. İndirgeme reaksiyonlarına katılan koenzimler; niasin ve koenzim Q içeren nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ile riboflavin içeren flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotiddir (FAD). Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), NAD'ye benzer ancak taşıdığı fazladan fosfor molekülü ile enerji üretiminden çok, biosentetik reaksiyonlara katılır. Koenzim A (KoA) ise, pantotenik asit ve reaktif bir sülfidril grubu içerir. Bu grup; ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağlarına analog

şekilde, asetat ve yağ asitlerini aktive eder (Physiology of The Heart, 4th Ed., sf. 543–569).

Bundan sonraki kısımda daha ayrıntılı bir şekilde incelenerek karbohidrat ve yağ asidi metabolizması reaksiyonlarında da özellikle NAD ve NADH ile FAD ve FADH₂ koenzimlerinin enerji eldesi ve tüketimindeki kilit rolleri ayrıntılı bir şekilde tartışılacaktır.

1.2.1.1. Glukoz metabolizması

Glukoz metabolizması; glikoliz, glukoz oksidasyonu, glukoneojenez gibi değişik amaçlara sahip çok sayıda reaksiyon zincirini kapsamaktadır. Tez çalışması boyunca yaptığımız deneyler glikoliz ve glukoz oksidasyonu reaksiyonlarını temel aldığı için ayrıntılı olarak bu iki reaksiyon zinciri açıklanacaktır.

Glikoliz, glukozun hücre içine alındıktan sonra, çeşitli enzimler tarafından yürütülen 9 basamakta piruvata kadar yıkımıdır. Glukoz oksidasyonu ise, glikoliz reaksiyonları sonucu açığa çıkan piruvatın, oksijen varlığında yıkımıdır. İki reaksiyon zinciri de, çeşitli fonksiyonların gerçekleşmesi için kullanılmak üzere farklı miktarlarda enerji açığa çıkarır.

1.2.1.2. Glikoliz ve glukoz oksidasyonu

Glikoliz; 1 mol glukozun, 2 mol piruvat oluşturmak üzere, net 2 mol ATP ortaya çıkararak yıkılmasıdır. Reaksiyon zincirinde aslında 4 mol ATP açığa çıkmasına rağmen; 2 mol ATP, ilk basamaklarda reaksiyonların başlayıp ilerlemesi için hidrolize edilmektedir. Glikoliz reaksiyonları sırasında açığa çıkan indirgeyici ekivalan NADH üzerinden de, elektron transfer sistemi (ETS) aracılığıyla ATP elde edilebilir. Aerobik koşullarda, yani yeterince

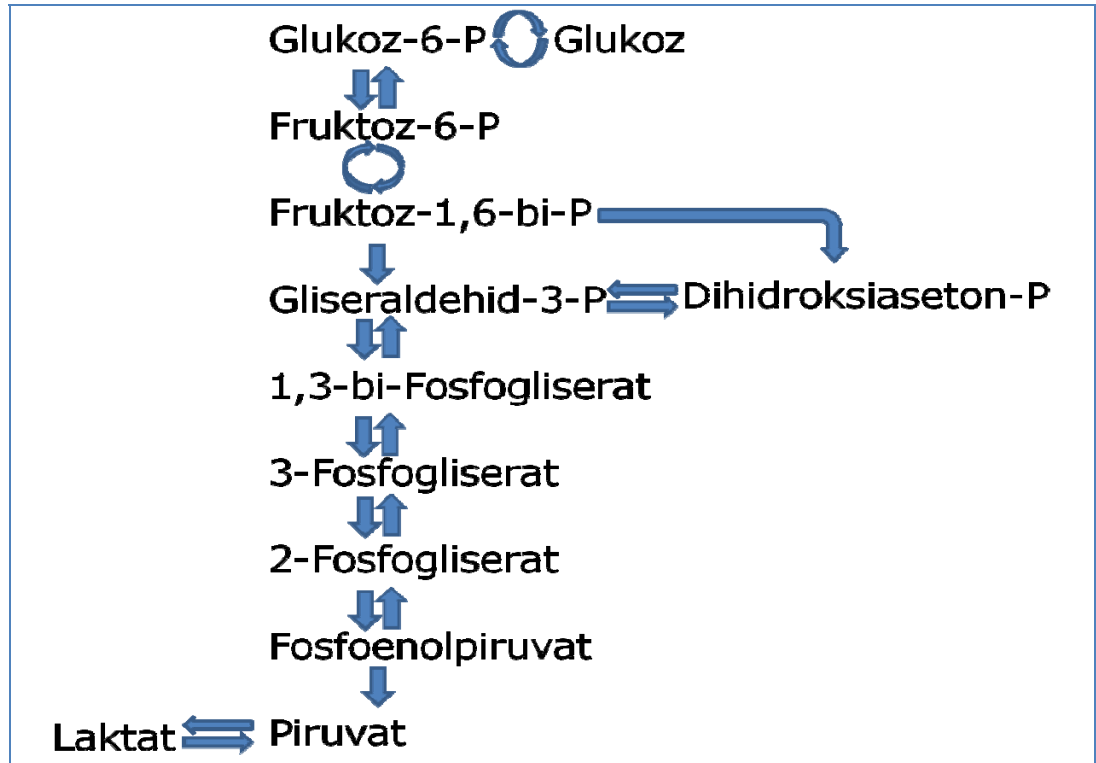
oksijenlenen kalpte, glikolizin son ürünü olan piruvat; asetil-KoA'ya dönüşüp oksidatif fosforilasyon reaksiyonlarına katılırken, anaerobik koşullarda laktata indirgenir.

Glikolitik yolak, özet olarak; glukoz-6-fosfat ve NAD⁺'yi, piruvat ve NADH'a çevirirken, her glukoz molekülü için iki ATP açığa çıkarır. Bu şekilde elde edilen piruvat ve NADH mitokondri matriksine taşınıp, CO₂ ve NAD⁺'ye dönüşerek aerobik oksidatif glikoliz sürecini tamamlar ya da sitoplazmada laktat ve NAD'a dönüştürülür ve nonoksidatif glikoliz reaksiyonları yürür.

Kalp sağlıklı ve iskemik değilken, yani normal koşullar altında bile laktat üretmektedir. Ancak, miyokard, kontrol edilemeyen diyabet veya iskemi gibi koşullar altında; yani, piruvat oksidasyonu yeterince gerçekleşmemesine rağmen, glikoliz hızı çok artığında tam bir laktat üreticisi haline dönüşür (Stanley ve ark. 1997). Kalpte sarkolemmadan laktat transportu monokarboksilik asit taşıyıcısı-I (MKT-I) aracılığıyla gerçekleşir ve MKT-I, laktatı doğrudan piruvat şeklinde hücre içine taşır.

Glikolitik yolak için substrat, endojen glukozdan veya glikojen depolarından elde edilir. Glukoz miyokard hücrelerine, konsantrasyon farkına bağlı olarak, ekstrasellüler boşluktan sitozole akış şeklinde girer. Hücre içine glukoz girişi işlemlerinin tamamının gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç olmamasına rağmen, glukoz plazma membranını basit difüzyon yoluyla geçemez. Bunun yerine glukoz alımı "glukoz taşıyıcısı" (GLUT) adlı bir aracı gerektirir. Kalpte yaygın olarak GLUT-4 izoformu bulunurken, az miktarda da GLUT-1 bulunur. Normal bazal koşullarda, GLUT-4 taşıyıcıların çoğu depolama veziküllerinde inaktif halde bulunur. İnsülin, iskemi ve hipoksi gibi etkenler GLUT-4 taşıyıcılarını plazma membranına göndererek, glukoz alımını hızlandırırlar. Sarkolemmada GLUT-4 translokasyonu AMP ile aktifleşen protein kinaz (AMPK) aktivasyonu ile de uyarılır (Russell ve ark., 1999). İskemi ve hipoksi gibi koşulların enerji gereksinimini artırması, dolayısıyla AMP seviyelerinin yükselmesi nedeniyle GLUT-4 translokasyonu indüklenir.

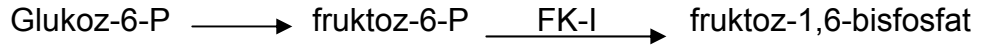
Kalp için bir başka glukoz kaynağı ise intrasellüler glikojen depolarıdır. Kalpteki glikojen havuzu (ıslak ağırlıkta ~30 $\mu\text{mol/g}$), iskelet kası (ıslak ağırlığında ~150 $\mu\text{mol/g}$) ile karşılaştırıldığında nispeten daha az olmasına ve doku konsantrasyonlarının sabit kalması gerekliliğine rağmen görece olarak daha hızlı bir dönüşüm gerçekleşmektedir (Opie, 1991). Eksojen substrat sağlanmasındaki artış ve/veya hiperinsülinemi, adrenerejik stimülasyon ile aktive olan glikojenolizis (siklik AMP ve kalsiyum konsantrasyonlarında artma nedeniyle), doku ATP içeriğindeki düşüş, iskemi veya yoğun egzersiz nedeniyle inorganik fosfat konsantrasyonundaki artış gibi etmenler glikojen konsantrasyonlarını artırır.



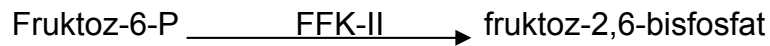
Şekil-1.2. Glikoliz reaksiyonları

Glikolizin üç basamakta kontrol edilir. Humoral kontrol, sempatik stimülasyonun glikoliz hızını artırmasına izin verir. Bu etki; fruktoz-6-fosfattan, fruktoz-1,6-bisfosfat oluşan basamakta, yani sağlıklı kalpte glikolizin hız sınırlayıcı ilk basamağında gözlemlenir. Buna benzer bir diğer kontrol ise,

heksokinaz adlı enzimin görev aldığı basamaktadır. Bu basamaklarda gerçekleşen fonksiyonel kontroller ile enerji üretimi ve enerji kullanımı eşitlenerek; yüksek ATP konsantrasyonlarının glikolizi inhibe etmesine veya serbest fosfor (P_i) varlığının, yani yüksek ADP veya AMP düzeylerinin glikolizi stimüle etmesine olanak sağlanır. Çok önemli üçüncü bir kontrol ise, piruvat-laktat dönüşümünü ve gliseraldehit-3-fosfat oksidasyonunu etkileyen okside koenzimlerin oranlarındaki değişiklikler üzerinden gerçekleşmektedir. Tüm bunların yanı sıra, glukozun hücre içine girişini sağlayan enzimler, taşıyıcılar ve diğer proteinlerin aktiviteleri veya sentezlerini etkilemek suretiyle uzun süreli bir kontrol sağlanabilir (van Bilsen ve ark., 1998).



Fosfofruktokinaz-I (FFK-I) glikolitik yolaktaki kontrol basamaklarından ilkidir, aynı zamanda ilk geridönüşsüz reaksiyonu katalizler. FFK-I, ATP kullanarak fruktoz-6-fosfattan fruktoz-1,6-bisfosfat üretir. ADP, AMP ve P_i varlığında aktive olurken, ATP konsantrasyonunun artması enzimi inhibe eder. Yani, fosforilasyon potansiyeli düştüğünde glikoliz yolunun akışını hızlandırmaktadır. FFK-I, ayrıca, reaksiyon ürünü fruktoz-1,6-bisfosfat ve düşük pH ile inhibe olur. Düşük pH'da gerçekleşen inhibisyon ATP varlığında daha da artmaktadır. FFK-I, aynı zamanda, fruktoz-2,6-bisfosfat ile uyarılabilir. Sitrat ise, FFK-I'in negatif allosterik regülatörüdür ve mitokondride oksidatif metabolizmada gerçekleşen değişiklikleri glikoliz yolağına aktarır.

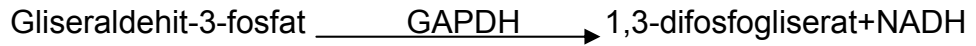


Fruktoz-2,6-bisfosfat; fosfofruktokinaz-2 (FFK-II) enzimleri aracılığı ile fruktoz-6-fosfattan oluşur, ayrıca, FFK-I'in de güçlü bir uyarıcısıdır. Yolak bu noktada çift taraflı kontrol edilmektedir ve FFK-II aracılığıyla fruktoz-2,6-bisfosfat sentezi ve konsantrasyonunun artması FFK-I aktivasyonuna neden olur. Fruktoz-2,6-bisfosfat, FFK-I'in fruktoz-6-fosfata afinitesini artırarak ve ATP'nin enzim üzerindeki inhibe edici etkisini azaltarak FFK-I aktivitesini

artırır. Fruktoz-2,6-bisfosfat üretimi oldukça iyi kontrol edilmektedir ve FFK-II aktivitesi ile üç ayrı basamakta kontrol edilir:

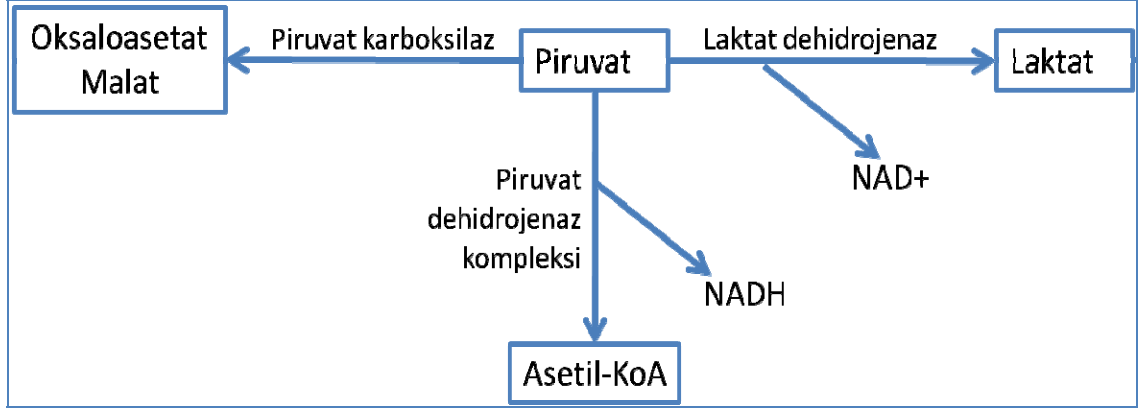
- 1) FFK-II aktivitesinin allosterik modülasyonu,
- 2) FFK-II aktivitesinin fosforilasyon ile kontrolü,
- 3) Enzim aktivitesinin transkripsiyonel kontrolü.

Sitratın, fruktoz-2,6-bisfosfat seviyelerini düşürerek FFK-I aktivitesini inhibe etmesi, sitrat varlığında FFK-II'nin allosterik inhibisyonunun ikinci bir mekanizmasıdır. İnsülin, glukagon, adrenalin, noradrenalin ve tiroid gibi glikolizi aktive eden bazı hormonlar FFK-II'yi de fosforilasyon ile kontrol ederler (Heart: Physiology and Pathophysiology, 5th Ed., 11. Bölüm). Ayrıca, AMPK da FFK-II'yi fosforile edebilir (Marsin ve ark., 2000).



Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) enzimi, gliseraldehit-3-fosfatın, 1,3-difosfogliserata dönüşümünü katalizler ve glikolizin ilk NADH moleküllerini üretir. Bu aşamada üretilen NADH molekülleri, aerobik koşullarda TCA döngüsüne katılırlar. Sitoplazmada NADH birikmesi, GAPDH enzimini inhibe ettiği için, bu basamak glikoliz yolağının en önemli kontrol noktalarından biridir. NAD⁺ artışı da, tam aksine, GAPDH aktivitesini uyarır. Yüksek laktat konsantrasyonları da, NADH'tan NAD⁺ oluşumunu inhibe ettiği için GAPDH aktivitesini azaltmaktadır. Miyokard iskemisi süresince, laktat ve dolayısıyla NADH akümüasyonu gerçekleşmesi de GAPDH'nin glikoliz yolağının asıl hız kontrol basamağı haline gelmesini sağlamaktadır.

Glikolitik yolda oluşan piruvat; laktata dönüşebilir, asetil-KoA'ya dekarboksile olabilir ya da oksaloasetat veya malata karboksile olabilir.



Şekil-1.3. Piruvat metabolizması

Piruvat dekarboksilasyonu, karbohidratların oksidasyon yolunun geridönüşümsüz basamağıdır ve piruvat dehidrojenaz (PDH) enzim kompleksi tarafından katalizlenir. PDH, mitokondri matriksine yerleşmiş ve birden çok enzimden oluşan bir komplekstir. Enzim kompleksinin E₁ alt ünitesi, spesifik bir PDH kinaz tarafından fosforilasyon ile inaktive olurken, yine spesifik bir PDH fosfataz tarafından defosforile edilerek aktive olur. PDH kompleksini inhibe eden PDK, piruvat ile inhibe olur. Düşük [asetil-KoA]/[serbest KoA] ve [NADH]/[NAD] oranları da PDK'yı inhibe eder (Randle ve Priesman, 1996). Dört izoformu bulunan PDK'nın, kalpteki baskın formu PDK-4'tür ve ekspresyonu açlık, diyabet gibi koşullar altında hızlıca artar. Kalpte adrenerjik stimülasyon ile sitozole Ca⁺² geçişinin ve mitokondride Ca⁺² konsantrasyonunun artması PDH aktivasyonu ile sonuçlanır. Yani adrenerjik indüksiyonla çalışması artmış kalpte, PDK-4 aktivitesinde değişiklik gözlenmezken (Sharma ve ark., 2004), daha fazla piruvat oksidasyonu ve PDH aktivasyonu görülmektedir (Goodwin, 1998).

Laktat oluşumu veya PDH tarafından oksidasyona uğramanın dışında, piruvat, malat veya oksaloasetata dönüşerek trikarboksilik asit döngüsüne katılabilir. Aerobik koşullarda, trikarboksilik asit döngüsü kaynağını %2-6 oranında piruvat karboksilasyonu sağlar (Stanley ve ark., 2004).

Glikoliz işlemleri boyunca 4 ATP elde edilip, 2'si yine bu süreçte harcanır ve net 2 ATP üretilir. Eğer süreç anaerobik koşullar altında devam ederse, önceki basamaklarda açığa çıkan NADH, elektronlarını pirüvata aktarır ve ETS üzerinden enerji elde edilebilir. Aerobik koşullarda gerçekleşiyor ise; açığa çıkan piruvattan oksidatif fosforilasyon ile 36 ATP elde edilir.

1.2.2. Yağ asidi metabolizması

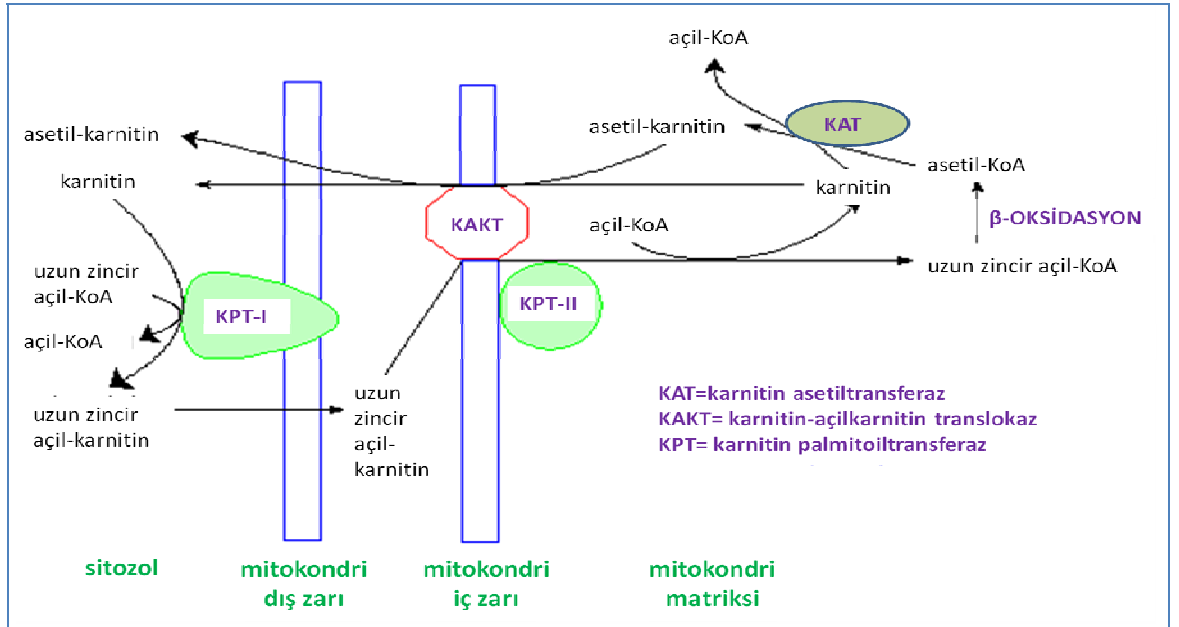
Yağ asidi metabolizması, yüksek oranlarda enerji açığa çıkarması nedeniyle kalbin fonksiyonlarının yerine getirilmesinde çok büyük önem taşımaktadır. Reaksiyonlar uzun zincirli bir yağ asidi molekülünün parçalanarak asetil-KoA molekülleri oluşturması ve bunların TCA döngüsüne katılmaları sonucu oksidatif fosforilasyon ile enerji üretilmesi şeklinde özetlenebilir.

1.2.2.1. Beta oksidasyon (β -oksidasyon)

Yağ asitleri mitokondri içine taşınıp, parçalanarak oksidasyona uğrarlar. Oksidasyon boyunca, yağ asidi zincirinin karboksil ucundan tekrarlanarak iki karbonlu asetil-KoA molekülleri koparılırken, indirgeyici elemanlar NADH ve $FADH_2$ açığa çıkar. Kopma $\alpha(2)$ - ve $\beta(3)$ -karbon atomları arasında gerçekleştiği için reaksiyon zinciri bu ismi almıştır.

β -oksidasyon mitokondride gerçekleşir. Yağ asitleri hücre içine pasif difüzyon veya sarkolemma üzerinden proteinler aracılığıyla ile taşınarak girerler. Yağ asidi taşıyıcıları (YAT) ve yağ asidi bağlayıcı proteinler (YABP) bu olayda aracılık etmektedir. Yağ asitleri, bir hücreye alındıktan sonra, yağ açıl-KoA sentetaz (tiyokinaz) tarafından sitozolde Ko-A türevlerine dönüştürülür. β -oksidasyon mitokondri matriksinde gerçekleştiği için,

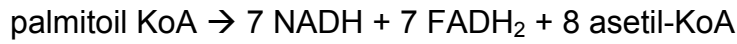
sitoplazmada bulunan uzun zincirli açil-KoA'nın mitokondri matriksinin içine taşınması gerekir. Oysa bu membran genellikle KoA gibi büyük ve polar moleküllere karşı geçirgen değildir. Bu nedenle, membrandaki spesifik taşıyıcı karnitin, açil gruplarını sitozolden mitokondri matriksine taşır. Bu işlem "karnitin mekiği" ismini alır (Şekil-1.4). Önce bir açil grubu sitozolik KoA'dan, mitokondri iç membranının dış yüzeyinde yerleşmiş olan karnitin açiltransferaz-I (KAT-I) aracılığı ile karnitine transfer edilir, böylece açil-karnitin oluşur. Sonrasında, karnitin-açil translokaz, uzun zincir açilkarnitininin iç mitokondri membranında yer alan serbest karnitin ile yer değiştirmesini sağlar. Matrikste, iç mitokondri membranının iç yüzeyinde bulunan karnitin açiltransferaz II (KAT-II) tarafından membranının iç kesiminde yer alan başka bir KoA molekülüne transfer edilir ve mitokondri matriksinde yeniden uzun zincir açil-KoA oluşur (Lippincott's Biyokimya, 2. Baskı., 17. Bölüm). Mitokondri membranında, açil zincirlerinin taşınmasında rol oynayan bu üç enzimden KAT-I, mitokondriye yağ asidi alımı hızını kontrol etmektedir (Lopaschuk, 1994).



Şekil-1.4. Mitokondri içine yağ asidi taşınması

β -oksidasyon ilk döngüsü, yağ asit zincirinin 2 karbon azalması ile sonuçlanan, her basamak için spesifik enzimlerle ilerleyen dört reaksiyonu kapsar. Bu enzimler de uzun, orta ve kısa zincirli yağ asidi parçacıkları için farklılık göstermektedir. Bu dört reaksiyon; $FADH_2$ üreten oksidasyon, hidrasyon, $NADH$ üreten ikinci bir oksidasyon ve bir molekül asetil-KoA salımını sağlayan tiyolitik yarıma şeklinde sıralanabilir. Dört basamak, çift sayıda (n) karbon içeren yağ asidi zincirleri için $(n/2)-1$ kez tekrarlanır. Her bir döngüde bir asetil grubu, bir $NADH$ ve bir $FADH_2$ üretimi gerçekleşir; sadece son yarımda iki asetil grubu açığa çıkar.

β -oksidasyon yolundan açığa çıkan enerji oldukça fazladır. Örnek olarak bir molekül palmitoil-KoA'nın CO_2 ve H_2O 'ya oksidasyonundan elde edilen ATP hesabı incelendiğinde:



- Açığa çıkan 7 $NADH$, elektron transfer sistemi üzerinden oksidasyona katılıp 3 ATP oluşturur (21 ATP),
- Açığa çıkan 7 $FADH_2$, ETS üzerinden oksidasyona katılıp 2 ATP oluşturur (14 ATP),
- Açığa çıkan 8 asetil-KoA, TCA döngüsünde CO_2 ve H_2O 'ya yıkılıp 12 ATP oluşturur (96 ATP).

Bir molekül palmitoil-KoA'dan toplamda $21 + 14 + 96 = 131$ ATP elde edilmektedir. (Ancak palmitik asit ile başlandığında, palmitoil-KoA oluşumu için de 2 ATP harcanacağı için net kazanç 129 ATP olacaktır.) (Lippincott's Biyokimya, 2. Baskı., 17. Bölüm).

1.2.2.2. Kalpte yağ asidi metabolizması ve regülasyonu

Kalpte yağ asidi alımı miktarı, temel olarak plazmada serbest halde bulunan yağ asidi konsantrasyonu üzerinden belirlenir. Plazmadaki serbest yağ asidi konsantrasyonu ise, sağlıklı bir birey için gün içinde 0,2 mM-0,8 mM aralığında değişiklik gösterebilir. İskemi veya açlık gibi metabolik koşullar altında, serbest yağ asitlerinin plazmadaki konsantrasyonu 1 mM seviyesine kadar yükselebilir (Lopaschuk ve ark., 1994). Serbest yağ asitleri, yüksek oranda hidrofobik olmaları nedeniyle gerçek anlamda serbest halde olmayıp, bunun yerine proteinlere veya büyük moleküllere bağlanmış halde bulunmaktadır. Plazmada ester halinde değilseler; albumine bağlanmış olarak ya da trigliserit, şilomikron veya çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) gibi şekillerde taşınırlar. Plazma serbest yağ asidi konsantrasyonunu adipositlerden salıverilen trigliseritlerin oranı belirlemektedir. Trigliseritler, hormona-duyarlı lipaz ile yıkıma uğrarken, gliserolfosfat açil transferaz ile sentezlenirler. Kanda bulunan net miktarı ise adipositlerden salıverilme oranını belirler (Lopaschuk ve ark., 1994). Hormona-duyarlı lipaz; katekolaminler ile aktive olurken, insülin ile inhibe edilir. Nitekim, açlık durumunda, yani kanda insülin düşük ve katekolaminler yüksek düzeydeyken, plazma serbest yağ asidi konsantrasyonu artar, bu da kalpte yüksek miktarda yağ asidi alımı ve oksidasyonu ile sonuçlanır. Adipositlerden salıverilmenin yanı sıra; kapiller endotelial hücreler ile kardiyomiyositlerin dışında bağlı bulunan lipoprotein lipaz enzimi ile şilomikronlar ve VLDL hidrolize edilip, yapılarında bulunan trigliseritler salıverilir (Augustus ve ark., 2003).

Yağ asitleri kardiyomiyosit içine pasif difüzyon veya sarkolemma üzerinden protein ile taşınarak girerler. Bu olay, yağ asidi translokaz enzimi ve plazma membran yağ asidi bağlayıcı protein aracılığı ile gerçekleşir. Spesifik bir yağ asidi taşıyıcısı protein olan CD36, iskelet kası ve kalp kasında çok miktarda bulunur ve kalpteki yağ asidi taşıyıcılarının baskın formu gibi görünmektedir (Van der Vusse ve ark., 2000). Kintaka ve ark.,

2006 yılında yaptıkları çalışmada CD36 geninde mutasyon olan bireylerin, normal bireyler ile karşılaştırıldığında, bir uzun zincirli yağ asidi analogu olan 15-(p-iyodofenil)-3-metilpentadekanoid asidin hücre içine alımının azaldığı sonucuna ulaşmışlardır. Bu da, insanlarda CD36'nın, miyokardiyal yağ asidi alımı regülasyonunda kısmen de olsa bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Ester halinde olmayan yağ asitleri sarkolemmada YABP ile bağ oluştururlar. Sonrasında ise yağ açıl-KoA sentaz (YAKS) enzimi aracılığıyla yağ-açıl KoA esterine dönüşürler. Yağ asidi bağlayıcı proteinler plazmada bol miktarda bulunur ve ester halinde olmayan yağ asitlerinin ana taşıyıcısı rolündedir. Araştırmalar, YABP ve YAKS enziminin sarkolemmal membranın sitozolik tarafında CD36 ile birlikte çalıştıklarını göstermektedir (Schaffer ve ark., 2002).

YAKS ürünü uzun zincir yağ açıl-KoA, gliserolfosfat açıl transferaz enzimi ile trigliserite esterleşebildiği gibi, KPT enzimi aracılığıyla uzun zincir yağ açilkarnitine dönüştürülebilir. Sağlıklı bireylerde, koroner arter hastalarında ve çok sayıda hayvan çalışmalarında, ¹⁴C-oleat veya ³H-palmitatın %70-90'ının kalp tarafından çabucak alınıp, ¹⁴CO₂ ya da ³H₂O şeklinde venöz dolaşıma salındığı gösterilmiştir (Wisneski ve ark., 1987; Chavez ve ark., 2003). Sağlıklı kalpte, hücre içine giren yağ asitlerinin %70-90'ı açilkarnitine dönüştürülüp hemen oksidasyona uğrarken; %10-30'u ise intrakardiyak trigliserit havuzuna katılmaktadır (Lopaschuk ve ark., 1994). Miyokardiyal trigliserit havuzu, yağ asitlerinin substrat olarak kullanılabilmesi için önemli bir kaynaktır. Trigliserit döngüsü, adrenerjik stimülasyon ile hızlandırılabilir ve kontrol altında tutulamayan diyabet varlığında veya iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde artış gösterebilir (Crass ve ark., 1975; Goodwin ve ark., 2000).

Yağ asitlerinin β -oksidasyonu temel olarak mitokondride, küçük bir kısmı da peroksizomlarda gerçekleşir. Oksidasyonun ana ürünleri NADH, FADH₂ ve asetil-KoA'dır. Elektron transfer sistemi veya trikarboksilik asit döngüsünde meydana gelen bir yavaşlama; asetil-KoA, FADH₂ ve NADH

birikmesine neden olacağı için β -oksidasyon da yavaşlayacaktır. Benzer şekilde PDH aktivitesindeki artış da asetil-KoA, $FADH_2$ ve NADH konsantrasyonlarının yükselmesine neden olacağı için β -oksidasyon hızını azaltır.

Yağ asidi oksidasyonunun hız sınırlayıcı basamağı olan KAT-I enziminin aktivitesi, enzime sitozolik tarafta bağlanan malonil-KoA tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilir. KAT-I enziminin iki izoformu vardır; KAT-I α karaciğer dokusunda baskın bulunurken, KAT-I β kalpteki yaygın izoformdur. KAT-I β , malonil-KoA inhibisyonuna KAT-I α 'dan 30 kat daha duyarlıdır (McGarry ve Brown, 1997). Malonil-KoA, kalpte, yağ asidi oksidasyonunun fizyolojik kontrolünde çok önemli bir rol oynamaktadır. Malonil-KoA konsantrasyonundaki düşüş yağ asidi alımını ve oksidasyonunu artırırken; konsantrasyonundaki artış yağ asidi oksidasyonunu baskılamaktadır. Malonil-KoA, asetil-KoA'nın, asetil-KoA karboksilaz (AKK) enzimi aracılığıyla karboksilasyona uğramasından açığa çıkar ve kalpte üretimi ve yıkımı sürekli devam etmektedir. Asetil-KoA'nın büyük kısmı kardiyomiyositlerde mitokondri içinde bulunur. Ancak, mitokondri dışında bulunan asetil-KoA'dan sentezlenen malonil-KoA KAT-I aktivitesini kontrol etmektedir. AKK aktivitesi, AMPK fosforilasyonu ile inhibe olmaktadır. AMPK aktivasyonu, malonil-KoA oluşumunda düşüş ve yağ asidi oksidasyonu hızında azalma ile sonuçlanır (Dyck ve Lopaschuk, 2002).

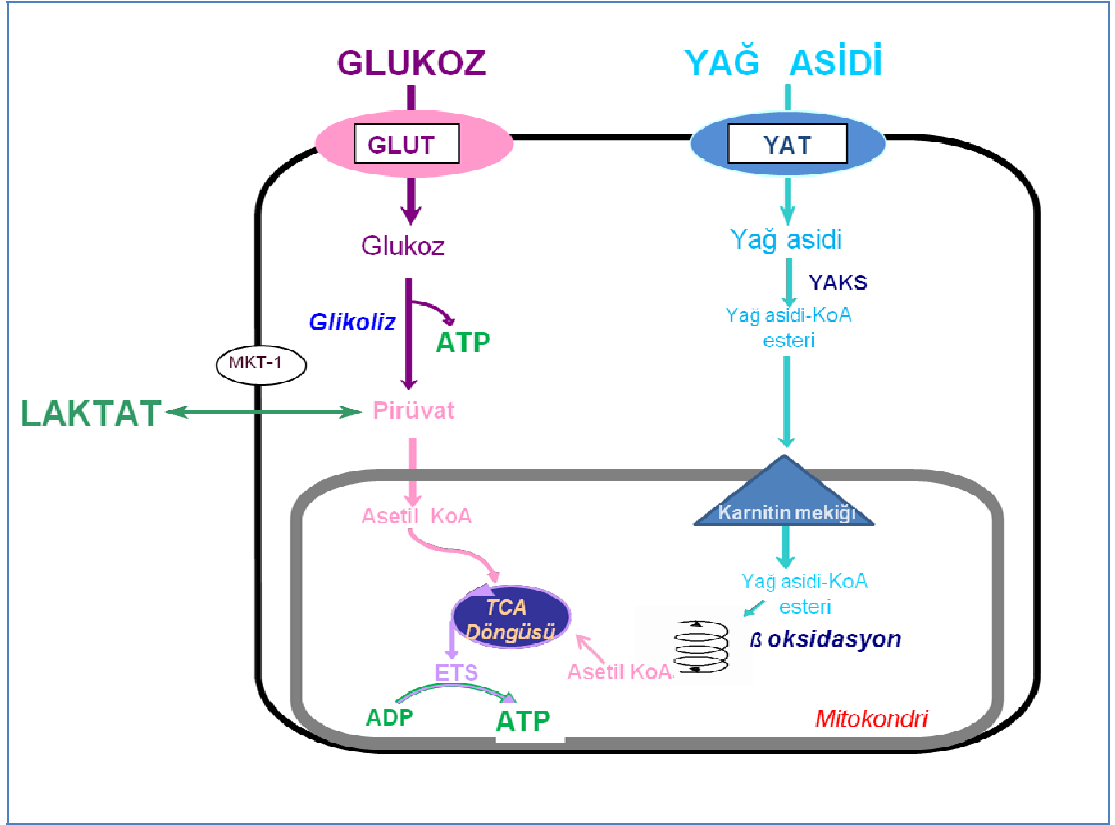
AMPK aktivitesi, karbohidrat metabolizması bölümünde de açıklandığı gibi, kalpte glukoz taşıyıcılarının translokasyonunu ve glukoz alımını stimüle etmektedir. Yani AMPK aktivitesi, hem karbohidrat metabolizmasını hem de yağ asidi metabolizmasını etkilemektedir. Egzersiz süresince olduğu gibi, kalbin çalışması arttığında, AMPK aktivitesi de artar; bu da hem karbohidratlar hem de lipitlerden asetil-KoA üretimini artırabilir. Böylelikle mitokondriye yeterli miktarda substrat sunulur (Coven ve ark., 2003). Malonil-KoA yıkımı, malonil-KoA dekarboksilaz (MKD) enzimi tarafından gerçekleşir. Enzim, hem sitozolde hem de mitokondride malonil-KoA'yı, CO_2 ve asetil-

KoA'ya yıkar. Genellikle, MKD aktivitesinin yüksek olduğu durumlar, miyokardiyal malonil-KoA konsantrasyonunda düşüş ve yüksek yağ asidi oksidasyonu ile sonuçlanır. MKD aktivitesinin farmakolojik inhibisyonunun miyokardiyal malonil-KoA konsantrasyonunu artırdığı ve MKD aktivitesinin yağ asidi oksidasyonunu kontrol ettiği kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, daha önceki çalışmalarda etomoksir gibi KAT-I inhibitörlerinde gözlemlendiği gibi MKD aktivitesinin inhibisyonu malonil-KoA dönüşümünü yavaşlatır (Robinson ve Zammit, 1982). Ayrıca; aerobik, iskemik ve de iskemi sonrası koşullar altında glukoz oksidasyonunu artırır ve iskemi sonrası kasılma fonksiyonunun iyileşmesini hızlandırır (Dyck ve ark., 2004).

1.2.3. Miyokard substrat metabolizması ve regülasyonu

Normal koşullarda kalbin ihtiyaç duyduğu ATP'nin tamamına yakını (>95%) mitokondrilerde gerçekleşen oksidatif fosforilasyondan, temel olarak da trikarboksilik asit döngüsünden elde edilir (Stanley ve ark., 2005). Bu reaksiyonlar ile enerji eldesinde kullanılan başlıca karbonlu yakıtlar ise glukoz ve yağ asitleridir.

Glukoz, laktat ve yağ asitleri gibi yakıtlar hücre içinde O₂ varlığında CO₂'e kadar yıkılırken, ortamdaki NADH ya FADH₂ gibi indirgeyici elemanların mediatörlüğünde, ETS üzerinden ATP sentezi gerçekleşir. Üretilen enerji; kalpte kasılma, sarkoplazmik retikulum Ca⁺² ATP-az veya Na⁺-K⁺ ATP-az gibi iyon pompalarının çalışması ve iyon dengesinin sağlanması gibi işlevleri yerine getirmek amacı ile kullanılır (Ingwall ve Weiss, 2004).



Şekil-1.5. Substratların hücre içinde izledikleri yollar

İyi perfüze olan kalpte üretilen asetil-KoA'nın, %50-70'i yağ asitlerinin β -oksidasyonundan; %30-50'si, yaklaşık olarak eşit miktarlarda laktat oksidasyonu ve glikolizden açığa çıkan piruvatın oksidasyonundan elde edilir (Wisneski ve ark.; 1985, 1987).

Miyokard metabolizması;

- kandaki karbon substratlarının konsantrasyonları,
- hormon konsantrasyonları,
- koroner akış,
- kalbin inotropik ve kronotropik durumu,
- dokunun kanlanması ve beslenme oranı (Stanley ve ark., 2005) gibi faktörlere bağlıdır.

Ancak, kalp temel olarak kendisine en çok sunulan karbonlu yakıt kullanmaktadır. Bu teoriyi en iyi açıklayan ise 1963'te yaptığı çalışmasıyla Dr.

Philip Randle olmuştur (Randle ve ark., 1963). Döngü, halen kendi adı ile “Randle Döngüsü” ya da “Glukoz-Yağ Asidi Döngüsü” diye anılmaktadır. Substratlar arasındaki dinamik etkileşmeleri inceler. Özellikle, kas ve yağ dokusunda oksidasyona uğramak için, glukoz ile yağ asitleri arasındaki yarışmaya dikkat çeker (Randle, 1998; Hue ve Taegtmeyer, 2009).

Randle Döngüsü’nde, temel olarak yağ asidi oksidasyonunun arttığı durumlarda, glukoz oksidasyonunun baskılandığı; glukoz oksidasyonunun arttığı durumlarda ise yağ asidi oksidasyonunun baskılandığı açıklanmaktadır. Yağ asidi oksidasyonu ile artan asetil-KoA üretimi, piruvat dehidrojenaz kinaz (PDK) enzimini aktive ederek piruvat, yani glukoz oksidasyonunu azaltır. PDK, aynı zamanda, artan yağ asidi oksidasyonuna bağlı olarak mitokondride $[NADH]/[NAD^+]$ oranının artması nedeni ile de aktive olmaktadır. Yağ asidi oksidasyonu kaynaklı asetil-KoA’nın TCA döngüsüne katılması da, sitratın FFK-I enzimini baskılayarak glikoliz üzerindeki inhibe edici etkinliğini artırır; ayrıca sitrat, “sitozolik asetil-KoA” gibi de çalışabilmektedir. Sonuç olarak, artan yağ asidi oksidasyonu, en çok glukoz (piruvat) oksidasyonunu inhibe ederek glukoz metabolizmasını baskılamaktadır.

Glukoz oksidasyonundan açığa çıkan asetil-KoA da yağ asidi oksidasyonunu baskılar. Yağ asidi oksidasyonunun son basamağındaki enzim olan 3-keto açil-KoA tiyolaz asetil-KoA inhibisyonuna duyarlıdır. Glukoz oksidasyonundan açığa çıkan asetil-KoA da, karnitin-asetilkarnitin transferaz (KAKT) enziminin bir substratıdır. KAKT, asetil-karnitini mitokondriden sitozole taşır ve asetil-karnitin burada sitozolik KAT enzimi aracılığıyla yeniden asetil-KoA’ya dönüştürülebilir. Sitozolik asetil-KoA da, asetil-KoA karboksilaz enziminin substratıdır. Bu enzim de, malonil-KoA üreterek KAT-I’i inhibe eder. Böylece karbohidrat (glukoz) oksidasyonu artığında, yağ asidi oksidasyonu baskılanır.

İki reaksiyon zinciri arasındaki etkileşim, mitokondri matriksinde bulunan substrat ve ürünlerin konsantrasyonlarına bağlıdır, çünkü reaksiyonların hızlarını bu konsantrasyonlar belirlemektedir (Randle, 1998; Lopaschuk ve ark., 2010).

1.2.4. Substrat seçiminin önemi

Hem glukoz hem de yağ asidi metabolizmalarının işleyişleri, önceki bölümlerde de açıklandığı gibi yakıt olarak seçilen karbonlu substrata göre değişiklik göstermektedir. Seçilen substrata göre; farklı yollardan, farklı miktarlarda oksijen harcanarak gerçekleşen mitokondriyal oksidatif fosforilasyon işlemlerinden açığa çıkacak enerji miktarı değişiklik göstermektedir. Başka bir deyişle kalbin, yakıt olarak kullandığı substrat, enerji eldesinin etkinliğini etkileyebilmektedir.

Enerji eldesinde substrat olarak;

- 1 mol glukoz kullanıldığında 36 mol ATP elde etmek üzere, 12 mol oksijen tüketilmekte; yani, 1 mol oksijen tüketilerek, 3 mol ATP elde edilmekte,
- 1 mol laktat kullanıldığında 18 mol ATP elde etmek üzere, 6 mol oksijen tüketilmekte; yani, 1 mol oksijen tüketilerek, 3 mol ATP elde edilmekte,
- 1 mol palmitik asit kullanıldığında 129 mol ATP elde etmek üzere, 12 mol oksijen tüketilmekte; yani, 1 mol oksijen tüketilerek, 2.6 mol ATP elde edilmektedir (Stanley ve ark., 1997).

	Üretilen ATP mol ATP/mol substrat	Tüketilen Oksijen mol O/mol substrat	ATP/O
Glukoz	36	12	3
Laktat	18	6	3
Palmitik asit	129	50	2.6

Çizelge-1.1. Miyokard tarafından seçilen substratın üretilen ATP/tüketilen oksijen oranına etkisi (Stanley ve ark., 1997)

Tablo 1.1’de özetlendiği gibi, substrat olarak glukoz seçildiğinde, ATP üretimi için daha az oksijen harcanmakta, yani, kalp çok daha etkin bir biçimde enerji elde edebilmektedir (Stanley ve ark., 1997, Ashrafian ve ark., 2007).

1.3. β -blokerler

β -blokerler, kalp yetmezliği için başlangıçta kontrendike kabul edilmişken, 1970’li yıllardan itibaren etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar (Waagstein ve ark., 1975; Swedberg ve ark., 1979).

İlk olarak, “I. kuşak β -blokerler” veya “non-selektif β -blokerler” şeklinde anılan ve kalpteki β_1 - ve β_2 -adrenerjik reseptörlerin her ikisinde de blokaj yapabilme özelliğine sahip propranolol, timolol gibi moleküller; sonrasında özellikle astımlı hasta gruplarında gözlemlenen istenmeyen non-selektif etkilerden dolayı sadece β_1 -adrenerjik reseptörlerde blokaj yapan “II. kuşak β -blokerler” veya “selektif β_1 -blokerler” şeklinde anılan bisoprolol, asebutolol gibi moleküller ve son olarak da, hem β_1 - ve β_2 -adrenerjik reseptörlerin her ikisinde de blokaj yapabilen hem de α -reseptörleri etkileyen “III. kuşak β -blokerler” karvedilol, nebivolol gibi moleküller geliştirilmiştir.

Ancak bu kadar yaygın kullanılan bu ilaç grubunun kalp yetmezliğinde kesin olarak ne tür bir mekanizma ile çalıştığı günümüzde hala aydınlatılamamıştır.

Olası çalışma mekanizmalarının;

- Sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve katekolaminlerin zararlı etkilerini engellemek,
- β reseptör oluşumunu ya da duyarlılığını artırmak,
- Kalp atım hızını yavaşlatmak,
- Mitojenik aktiviteyi önleyerek yeniden yapılanmayı (*remodelling*) azaltmak olduğu düşünülmektedir.

1.3.1. β -blokerler ve metabolizma

Uzun yıllar boyunca çeşitli β -blokerler ile gerçekleştirilen çalışmalar, bu ilaç grubunun kalp yetmezliği tedavisinde etkin bir yeri olduğunu göstermiştir. 1999 yılında gerçekleştirilen “Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure” (MERIT-HF) adlı çalışmada metoprolol ve bisoprololün KKY hastalarında ölüm oranını azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Packer ve ark., 1996 yılında gerçekleştirdikleri “U.S. Carvedilol Heart Failure Study” adlı çalışmada, karvedilol ile tedavi edilen grupta hastanede tedavi riskinin %65 oranında azaldığını göstermişlerdir. Ancak, çalışma süresi kısa tutulunca, özellikle şiddetli kalp yetmezliği hastaları grubu için sonuçların değerlendirilmesinde sorun yaşanmıştır. Bunun üzerine Packer ve ark., 2001 yılında, COPERNICUS (The Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study) çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Ortalama 10 ay boyunca, 2289 şiddetli kalp yetmezliği hastasına karvedilol ya da plasebo verilerek tedavi edilmiş, sonuçta karvedilol ile tedavi edilen grupta ölüm oranında %35 düşüş saptanmıştır.

Ancak yapılan çalışmalar, non-selektif ve selektif β_1 -blokerlerin, kalp yetmezliği tablosundaki olumlu etkilerinin aksine, başta insülin rezistansını ve

diyabet gelişmesini artırarak metabolik tabloyu kötüleştirdiğini göstermektedir. β_1 selektif blokerleri atenolol, %13; metoprolol ise, %20 oranında insülin duyarlığında azalmaya neden olmaktadır (Pollare ve ark.,1989 (a) ve (b)). Pindolol ve propranolol kullanan hastalarda insülin duyarlığı sırasıyla %17 ve %34 azalmıştır (Lithell ve ark., 1992). Antihipertansif selektif olmayan β -bloker kullanımının diyabet oluşumunu artırmaktadır (Samuelsson ve ark., 1994). “Atherosclerosis Risk in Communities Study” (ARIC) adlı çalışmada β -bloker kullanımının genel olarak diyabet gelişmesini %28 oranda artırdığı gösterilmiştir (Gres ve ark., 2000).

Jacob ve ark., 1996 yılında, tüm bu bulguların aksine; antioksidan, antienflamatuvar ve α_1 bloker etkinliği (Kopecky, 2006) ile bir 3. kuşak β -bloker olan karvedilolün, insülin duyarlığını artırdığını ve serum lipid profilini düzelttiğini göstermiştir.

Bu gelişmeden sonra karvedilol üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri olan COMET (Carvedilol Or Metoprolol European Trial), ilk olarak 1996 yılında tasarlanmış ve 2000’li yılların başında, Finlandiya’da 3000 civarında hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. COMET, 5 yıl süreyle kalp yetmezliği hastalarında karvedilol ve metoprolol kullanımını karşılaştırmıştır. Hastalar arasında, karvedilol kullananlarda ölüm oranı %5.7; diyabet oluşma riski ise %22 azalmıştır (Poole-Wilson ve ark.; 2002, 2003; Torp-Pedersen ve ark., 2005).

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda propranolol, metoprolol, bisoprolol gibi selektif ya da selektif olmayan β -blokerler, kalp yetmezliğinde faydalı olsalar bile, dokuda insülin duyarlılığını azaltarak metabolik tabloyu kötü etkilediği ortaya çıkmışken, karvedilolün bunun tam tersi bir etki gösterdiği bulunmuştur.

1.3.2. Karvedilol ve olası metabolik etkileri

Kalp yetmezliği, kalbin, vücudun gereksinim duyduğu oksijeni hücrelere ulaştıracak kanı pompalayamaması durumudur. Yetmezlik durumundaki kalp yeterince oksijenlenememekte ve yeterince enerji üretilememektedir (Wallhaus ve ark., 2001). Bu şartlar altında enerjinin daha etkin yollarla elde edilebilmesi çok daha önemli bir hale gelmektedir. İskemi veya hipertrofi gibi nedenlerin kalp metabolizmasını değiştirdiği ise bir gerçektir (Sambandam ve ark. 2002, Ashrafian ve ark., 2007). Karvedilolün, diğer β -blokerlerden farklı olarak olumlu metabolik etkilerinin olduğu pek çok çalışma ile desteklenmiştir. Bu etkinin ilacın, kalbin enerji elde etmek için yakıt olarak kullandığı substratı değiştirmesi ile ilgili olabileceği düşünölmektedir.

1985'te hepatositlerde gerçekteştirdikleri çalışmalarda Oberhaensli ve ark. noradrenalinin palmitik asit oksidasyonunu artırdığını ve bu etkinin bir α_1 adrenerjik reseptör blokeri olan prazosin ile ortadan kalktığını bildirmişlerdir. 1987 yılında ise, noradrenalinin hepatositlerde lipojenezisi inhibe ederken yağ asidi oksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Noradrenalinin lipojenezis üzerindeki etkisinin α_2 ya da β -blokerlerler ile değişmeyip, α_1 -bloker prazosin varlığında ortadan kalkması (Stark ve Keller, 1987), etkinin α_1 -adrenerjik reseptörler aracılı olduğunu göstermektedir. 1996 yılında, Jacob ve ark. diyabeti olmayan hipertansiyon hastalarında gerçekteştirdikleri çalışmada, 12 haftalık tedavi sonrasında metoprolol insölin duyarlılığını azaltırken; karvedilolün doku insölin duyarlılığını ve glukoz kullanımını artırdığını göstermiştir. Karvedilol, başka bir α - ve β -adrenerjik reseptör blokeri olan labetalole de üstün bulunmuştur (Bell, 2004). 2005'te, Al-Hesayen ve ark. yaptıkları çalışmada karvedilol ve metoprolölü karşılaştırmış; metoprolol herhangi bir değişiklik gerçekteştirmezken, karvedilolün miyokardiyal yağ asidi kullanımını %20 oranında azalttığı sonucuna ulaşmıştır.

Tez çalışmasında çeşitli β -blokerlerden karvedilol, metoprolol ve bisoprolol ile α -bloker prazosinin metabolizma üzerindeki etkileri miyosit

hücre kültüründe karşılaştırılmış; ölçümler, sempatik aktiviteyi taklit etmek amacıyla bir kez de adrenalin varlığında tekrar edilmiştir. Çalışmanın amacı, karvedilolün diğer beta blokerlerden farklı şekilde ortaya koyduğu olumlu metabolik etkilerinin hangi reseptörler üzerinden ve nasıl gerçekleştiğini göstermektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan araç ve gereçler

2.1.1. Malzemeler

- Etüv (Blue Pard PH050A, ÇİN)
- Laminar akış (Holten LaminAir S2010 1.8 EN GE 1LN U, DANİMARKA)
- İnkübatör (Sanyo, MCO-18AIC, JAPONYA)
- Sintilasyon ölçüm cihazı (LKB Wallac, 1211 Rack Beta Liquid Scintillation Counter, KANADA)
- UV spektrofotometresi (Shimadzu, UV-visible-240, JAPONYA)
- Hassas terazi (Scaltec, SBA 31 Heiligenstadt, ALMANYA)
- Faz-kontrast eklentili mikroskop (Micros, MCX1600, AVUSTURYA)
- Otoklav
- *Sonicator*
- Su banyosu
- Termometre
- %95 oksijen, %5 karbondioksit içeren gaz karışım tüpü
- Vortex
- Buzdolabı
- Manyetik karıştırıcı
- Diyaliz membranı (Sartorius SM 11106-047N)
- Kronometre
- 2 ml'lik, 5 ml'lik, 10 ml'lik ve 20 ml'lik pipetler
- Pipet uçları
- *Multichannel/Çok Kanallı Pipet (Socorex, İSVİÇRE)*

- Flasklar
- Cryo-vialler
- Eppendorf tüpler
- Falcon tüpler
- Çeşitli cam malzemeler

2.1.2. Kimyasal maddeler

- Karvedilol (β_{1-2} ve α_1 bloker)
- Propranolol (β_{1-2} bloker)
- Bisoprolol (β_1 1 bloker)
- Prazosin (α_1 bloker)
- Adrenalin
- AICAR (aminoimidazol karboksamid ribonükleotid)
- Gamma globulin
- Dulbecco's Modified Eagle's Serum (DMEM)
- Glukozsuz DMEM
- Tripsin-EDTA çözeltisi
- *Phosphate Buffered Saline*
- Streptomisin
- Penisilin G
- ^{14}C -Glukoz
- Palmitik asit
- Bovine Serum Albumin (BSA)
- Etanol
- Sodyum bikarbonat
- Potasyum hidroksit
- Perklorik asit
- Sintilasyon kokteyli (MP EcoLite™, ABD)

2.1.3. Hücreler

Deneyleerde, Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden satın alınan C2C12 (*Mus musculus* kaynaklı miyoblast) hücre serileri (*cell line*) kullanıldı.

2.2. Kullanılan Yöntemler

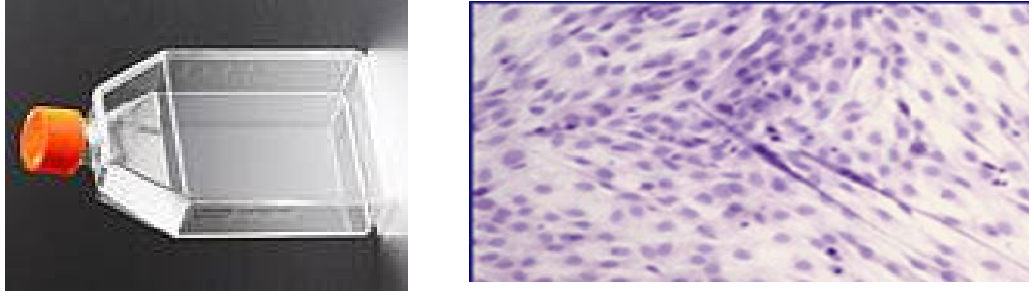
2.2.1. Hücre Kültürü

Deneyleerde, Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen *Mus musculus* kaynaklı miyoblast C2C12 hücre serileri kullanıldı. C2C12 hücreleri ilk olarak 1977 yılında Yaffe ve Saxel isimli araştırmacılar tarafından fareden elde edilmiştir. C2C12 hücreleri sonsuz sayıda pasajlanamadıkları için deneyleere başlamadan bir miktar hücre donduruldu.

Hücrelerin sağlıklı çoğalması ve kullanılacak metotların validasyonu sağlandıktan sonra çalışmalara başlandı.

2.2.1.1. Hücrelerin çoğalması

Hücreler; %10 (v/v) fetal sığır serumu (*Fetal Bovine Serum* (FBS)) ve koruma amaçlı 100U/ml penisilin ile 100µg/ml streptomisin (%1 oranında) antibiyotik karışımı eklenen *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) büyüme ortamında (*growth medium*), yüzeyleri özel olarak muamele edilmiş flasklarda çoğaltıldı (Şekil-2.1).



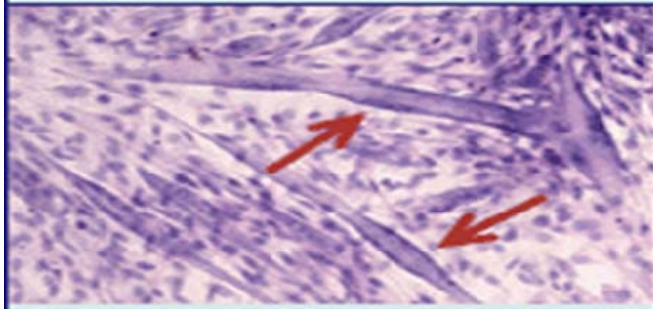
Şekil-2.1. Hücrelerin çoğaltıldığı flasklar (sol tarafta) ve %10'luk ortamdaki hücrelerin görünüşü (sağ tarafta).

2.2.1.2. Hücrelerin bölünmesi (pasajlama)

Haftada iki kere mediumları değiştirilen hücreler, iki hafta sonunda, yeterli doluluğa ulaşıp yeni flasklara bölündü. Bu işlem için, flasklar öncelikle tampon çözelti (*Phosphate Buffered Saline (PBS)*) ile bekletilip sonrasında flask yüzeyinden ayrılmaları için tripsin-EDTA ile muamele edildi ve kısa süreli inkübasyona bırakıldı. Flaskların yüzeyinden kalkan hücrelerin üzerine yeniden medium eklenip, hücreler homojenize edilerek eşit miktarlarda yeni flasklara paylaştırıldı (Flasklar; içindeki hücrelerin çoğalma miktarına göre, 3 ya da 4 flaskta bölündüler). Her işlem basamağında, kullanılan tüm çözeltilerin sıcaklığının 37°C olmasına özen gösterildi.

2.2.1.3. Hücrelerin deneye hazırlanması

Flasklar %80 oranında akışkanlığa ulaştıktan sonra, FBS oranı %1'e düşürülüp hücrelerin miyotüp formuna dönüşmesi (*differentiation*) sağlandı (Perdomo ve ark., 2004). Şekil-2.2.'de görülebilecek, gerekli morfolojik değişikliğin mikroskop altında gözlenmesinin ardından deneylere başlandı. (Yaptığımız denemeler, hücrelerin miyotüp şekline dönüşmesi için %1 oranında serum içeren ortamda en az 10 gün bekletilmesi gerektiğini göstermiştir.)



Şekil-2.2. %1'lik ortamda gerçekleşen miyotüp oluşumu.

2.2.1.4. Validasyon

Hücrelerde gerekli morfolojik değişikliğin tamamlanmasının ardından, deneylerin öncesinde her substrat için protein miktarı/metabolik hız testi yapıldı. Flask içindeki hücre miktarı (protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir (Bradford, 1976)) ile gerçekleşen reaksiyon hızının doğru orantılı olması beklenmektedir. Validasyon işlemleri tamamlandıktan sonra deneylere geçilmiştir.

Deneyler süresince bir settaki deney gruplarının her birinin en az 4 flasktan ($n=4$) oluşması sağlandı (4 adet kontrol grubu flaskı, 4 adet karvedilol eklenen flask, 4 adrenalin ile stimüle edilen adet flask gibi). Çalışmalar sırasında pasajlama işlemlerinin metabolik ölçümlerde değişikliğe neden olduğu belirlendi. Bu nedenle yapılan her deney için kullanılan flaskların aynı pasaja ait olmasına özen gösterildi. Yani 1 kez pasajlanan hücrelerin sonuçları ile 4 kez pasajlanan hücrelerin sonuçları birbiriyle karşılaştırılmadı.

2.2.1.5. Sterilizasyon

Hücrelerin, sağlıklı ve kontaminasyon riski doğmadan çoğalmaları için sterilize koşullarda çalışılmaya çok dikkat edildi. Laboratuar her çalışmadan

önce 30 dakika UV lambası ile sterilize edildi, deneyler ve uygulamalar süresince %96 alkol ile yıkanan steril eldivenler kullanıldı. Tüm çalışmalar, prosedür gereği 30 dakika önce çalıştırılmaya başlanan laminar akış altında gerçekleştirildi.

Hücrelerin steril koşullar altında çoğalması için, 37°C sıcaklık ve %5 karbondioksit oranının sabit tutulduğu inkübatör, kapağı açıldığı takdirde 15 dakika süreyle, içindeki UV lambası ile kendini sterilize edecek şekilde programlandı. Bunun dışında gereken durumlarda içi alkolle temizlendi. İçerisinde dolaşan steril suyun değiştirilmesi gereken zamanlarda, standart prosedür olan 121°C sıcaklıkta, 30 dakika sterilize edilen distile su kullanıldı ve bu süreçte içindeki inkübatör tepsi de aynı koşullarda sterilize edildi.

Herhangi bir kontaminasyon olup olmadığını gözlemlemek adına, flasklar belirli periyotlarda faz-kontrast mikroskop altında gözle kontrol edildi.

2.2.2. Glikoliz

Deney; glikoliz reaksiyonunun, 2-fosfogliserat → fosfoenol pirüvat basamağında açığa çıkan bir molekül sudaki ($^3\text{H}_2\text{O}$) trityumun yaydığı radyoaktif enerjinin sintilasyon cihazında ölçülmesi ile hücrelerin kullandığı glukoz miktarının hesaplanması esasına dayanır.

Deney için her flaska, Glukozsuz-DMEM içine trityumla işaretlenmiş steril 5- ^3H (N)-glukozun eklendiği medium koyuldu. İki saatlik inkübasyonun ardından, flasklardan eppendorf tüplere örnek alınıp; bu tüpler, içinde su bulunan sintilasyon tüplerinin içine yerleştirildi ve 50°C etüvde bir gece uçmaya bırakıldı. Uçurma işlemi (Hughes ve ark., 1993) ile eppendorf tüpü ve sintilasyon tüpünde yer alan iki su kompartmanı denge haline gelmiştir. Böylece, sintilasyon tüpündeki sudaki radyasyon miktarı, flasktan aldığımız örnekteki radyasyon miktarının %50'si kadar olmuştur.

Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile her flasktaki hücre protein miktarı belirlenip, metabolize edilen glukoz miktarı ile karşılaştırılıp glikoliz hızı hesaplandı.

2.2.3. Glukoz oksidasyonu

Glikoliz reaksiyonlarının sonucunda oluşan piruvat, oksidatif fosforilasyon için asetil-KoA şeklinde TCA döngüsüne katılır ve karbondioksite parçalanır., Deney sırasında flaskta gerçekleşen reaksiyonlar sonucu, glukoz üzerindeki radyoaktif işaretli ^{14}C 'un, büyük bir kısmı $^{14}\text{CO}_2$ formuna dönüşürken, az bir kısmı ise bikarbonat ($\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$) iyonu şeklinde çözünür. Deneyin esası; bikarbonat şeklinde çözünen ve gaz haldeki $^{14}\text{CO}_2$ 'i toplayıp, radyasyon miktarını belirleyerek, kullanılan glukoz miktarını bulmaktır.

Her flasktaki hücreler; bölme protokolündeki gibi tripsinle flaskların yüzeylerinden kaldırılıp, protein tayini için bir miktar ayrıldı ve kalan kısmı 6 çukurlu flaskta yeniden ekim yapıldı. Hücrelerin yeterince tutunması için bir günlük beklemenin ardından steril ^{14}C işaretli glukozla hazırlanmış medium ve belirlenen gruplara göre ilaçlar eklenip, flask boyutlarında KOH emdirilmiş filtre kağıdı ile üzeri kapatıldı ve iki saatlik inkübasyona bırakıldı.

$^{14}\text{CO}_2$ 'nin, filtre kağıdına geçeninin dışında bir kısmı çözelti içinde bikarbonat şeklinde bulunur. Bu kısmı da elde edebilmek için çukurlara perklorik asit (HClO_4) eklenip $^{14}\text{CO}_2$ 'nin tamamının filtre kağıdına geçmesi için, flasklar 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra filtre kağıtları katlanarak sintilasyon tüplerine alındı (Dimopoulos ve ark., 2007).

Sintilasyon sayımı cihazında $^{14}\text{CO}_2$ üzerinden yapılan radyoaktivite ölçümlerinin sonuçları ile flaskların içindeki protein miktarları karşılaştırılarak glukoz oksidasyonu hızı hesaplandı.

2.2.4. Palmitik asit oksidasyonu

Deney; [9,10-³H] palmitik asitten oluşan 8 asetil-KoA'nın, TCA döngüsüne katılması sonucu açığa çıkan ³H₂O miktarının hesaplanması esasına dayanır. Palmitik asit molekülünde, 9 ve 10. C'lar üzerinde yer alan H'lerin, TCA döngüsünden spesifik olarak su biçiminde açığa çıktığı daha önce kanıtlanmıştır (Wisneski ve ark., 1987; Chavez ve ark., 2003).

Glukozsuz DMEM çözeltisi içine yağ asidi içermeyen BSA Albumin tozu eklenerek çözülerek ilk çözelti hazırlandı.

2mM konsantrasyonda olacak yağ asidi çözeltisi için; 0.05128g palmitik asit tozu hassas olarak tartılıp, üzerine Na₂CO₃ ve distile su eklenip, beherde çözeltinin üst sınırı işaretlendi. Bu karışıma, çözünmeyi kolaylaştırmak üzere, 10ml %95 a/h etanol ve 10 ml 5µCi/ml'lik palmitik asit çözeltisi eklendi. Hazırlanan karışım, ısıtıcıda karıştırılarak daha önce işaretlenen çizgiye kadar etanol uçuruldu. Böylece, çözeltinin radyoaktivite konsantrasyonunun 0.5µCi/100ml olması sağlandı.

İki çözelti karıştırılarak diyaliz membranı içine alındı. Membran glukozsuz-DMEM çözeltisi içinde buzdolabında 24 saat diyalize bırakıldı. Deneylerde, medium olarak diyaliz membranı içindeki çözelti, kontaminasyonu önlemek üzere, steril filtreden geçirilerek kullanıldı.

Palmitik asit oksidasyonu deneyleri öncesinde, yağ asidi oksidasyonunu kesin olarak artırdığı bilinen AICAR (aminoimidazol karboksamid ribonükleotid) eklenen flasklarda palmitik asit oksidasyonu hızı ölçülmüş, pozitif sonuç alınmasının ardından deneylere başlanmıştır.

Flasklar; "kontrol" ve "ilaç eklenen" gruplara ayrılıp, üzerilerine deney için özel hazırlanan medium eklenip 2 saatlik inkübasyona bırakıldı. Her flasktan alınan 500µl'lik örnekler; küçük tüplere koyulup, bu tüpler de içinde

1.25 ml su bulunan sintilasyon tüplerine yerleştirilip, 50°C sıcaklıkta bir gece uçmaya bırakıldı (Hughes, 1993).

Sintilasyon sayımı yapılan $^3\text{H}_2\text{O}$ miktarı, flasklardaki hücre miktarı ile karşılaştırılarak palmitik asit oksidasyonu hızı belirlenmiştir.

2.2.5. Adrenalinle stimülasyon

Kalp yetmezliği tablosunda karşılaşılan, sempatik sistemin aşırı aktivasyonu sonucu, dolaşımda yüksek konsantrasyonlara ulaşan katekolamin varlığını taklit etmek amacıyla; flasklar “kontrol grubu” “sadece adrenalin eklenen grup”, “sadece ilaç eklenen grup” ve “adrenalin+ilaç eklenen grup” şeklinde ayrılıp, glikoliz hızı ve palmitik asit oksidasyonu hızı ölçümü deneyleri bir kez de bu şekilde gerçekleştirildi.

2.2.6. Bradford protein miktar tayini

2 mg/ml konsantrasyondaki Bovine Gama Globulin stok çözeltisinden; 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml ve 2 mg/ml konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

Bu standartlar ile deneyler sonunda flasklardan kazıyıp homojenize edilmiş olan numunelerden alınan örneklere, Bradford boyası ekleyerek açığa çıkan mavi renk spektrofotometrede okutulup spesifik olarak her flasktaki protein miktarı belirlendi (Bradford, 1976).

Her flaskta aynı miktarda hücre çoğalmadığı için sonuçları standardize etmek adına, her flask için spesifik olarak “kullanılan glukoz/protein miktarı” ya da “kullanılan yağ asidi/protein miktarı” oranları belirlendi.

2.2.7. İstatistiksel analiz

Tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İki deney grubu karşılaştırılırken Student's t-test; ikiden fazla grubun yer aldığı veriler karşılaştırılırken ise, ANOVA ve sonrasında Tukey-Kramer analizleri yapılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Validasyon

Hücrelerin flasklarda sağlıklı çoğalmaları için haftada iki kez mediumları değiştirildi ve belirli doluluk oranına ulaştığında pasajlandılar. Her medium değişikliği ve pasajlama aşamasında flasklar faz-kontrast eklentili mikroskop altında incelendi. Sağlıklı çoğalan hücreler ile deneyler gerçekleştirildi.

Validasyon çalışmalarında, her ilaç için 3 farklı konsantrasyonda çalışılmasına karar verildi. Ancak, her deney setinde aynı pasajdan hücrelerin kullanılması gerekliliği deney grubundaki örneklem sayısını kısıtladığı için, her ilaç için ön denemelerdeki bulguların ışığında belirlenen bir konsantrasyon seçilerek, tüm deneyler bu konsantrasyonda ilaç kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2. Hücrelerin miyotüp formuna dönüştürülmesi (*Differentiation*)

Literatür bilgilerinden yola çıkarak medium olarak FBS oranının %1'e düşürülüp, hücrelerin miyotüp formuna dönüşmesi sağlandı (Perdomo ve ark., 2004). Mikroskop altında sürekli takip edilerek, gerekli morfolojik değişikliğin gerçekleşmesi için FBS oranının %1'e düşürülmesinin ardından hücrelerin bu ortamda en az 10 gün bekletilmesi gerektiği sonucuna ulaşıldı.

3.3. Dinlenme halindeki hücrelerde gerçekleştirilen deneyler

Bu deneylerde; karvedilol, bisoprolol, metoprolol ve prazosinin tek başlarına hücre metabolizması üzerindeki etkileri incelendi. Karvedilol,

bisoprolol, metoprolol ve prazosinin; palmitik asit, glikoliz ve glukoz oksidasyonu üzerindeki etkileri ayrı ayrı değerlendirildi.

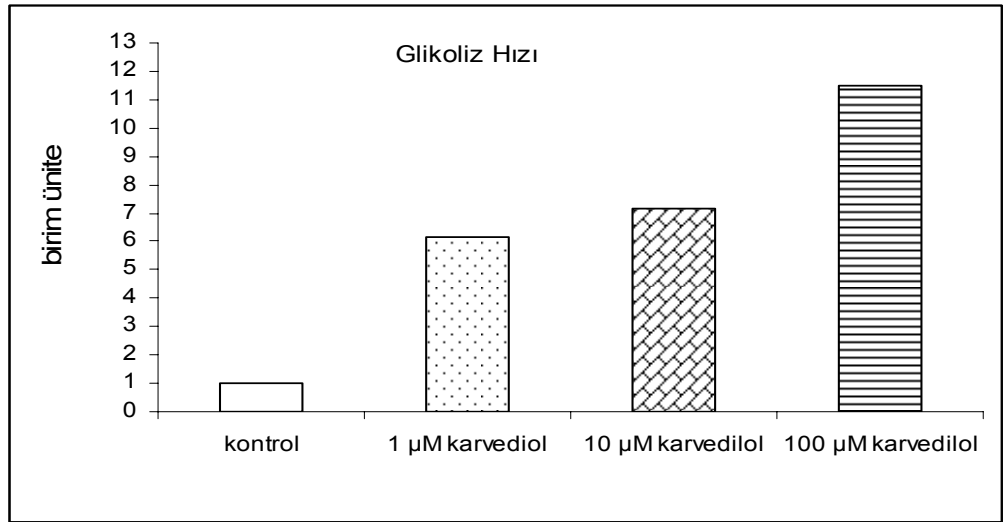
3.4. Glikoliz hızı

3.4.1. Karvedilol ile glikoliz hızı deneyi

Yapılan ön denemelerle glikoliz hızı deneyi için 2 saatlik inkübasyon süresinin yeterli olduğuna karar verildi.

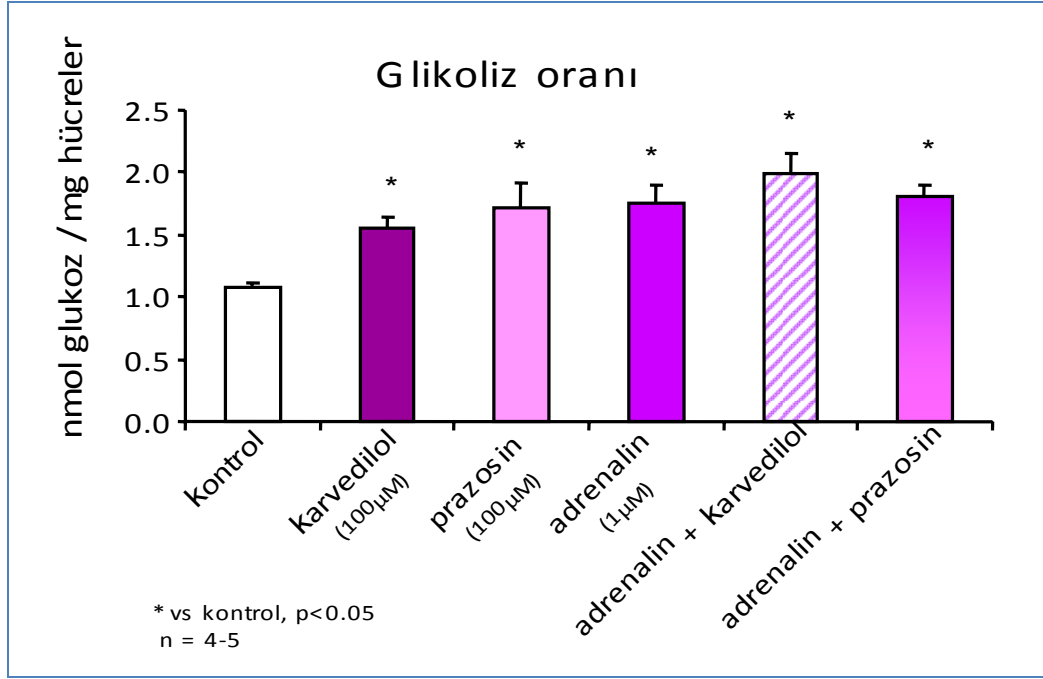
Flasklara 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda karvedilol eklenerek gerçekleştirilen glikoliz hızı ölçümü deneyinde karvedilolün doza bağlı olarak glikoliz hızını artırdığı sonucuna ulaşıldı.

Şekil 3.1'de gösterilen sonuçlar 4. pasaj sonrası flasklara aittir.



Şekil- 3.1. 10^{-6} M, 10^{-5} M ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda karvedilol ile glikoliz hızı ölçümü deneyi sonuçları (n=2-3)

3.4.2. Adrenalin varlığında glikoliz hızı deneyi



Şekil-3.2. α -bloker, β -bloker varlığında ve adrenalin stimülasyonu ile glikoliz hızındaki değişiklikler

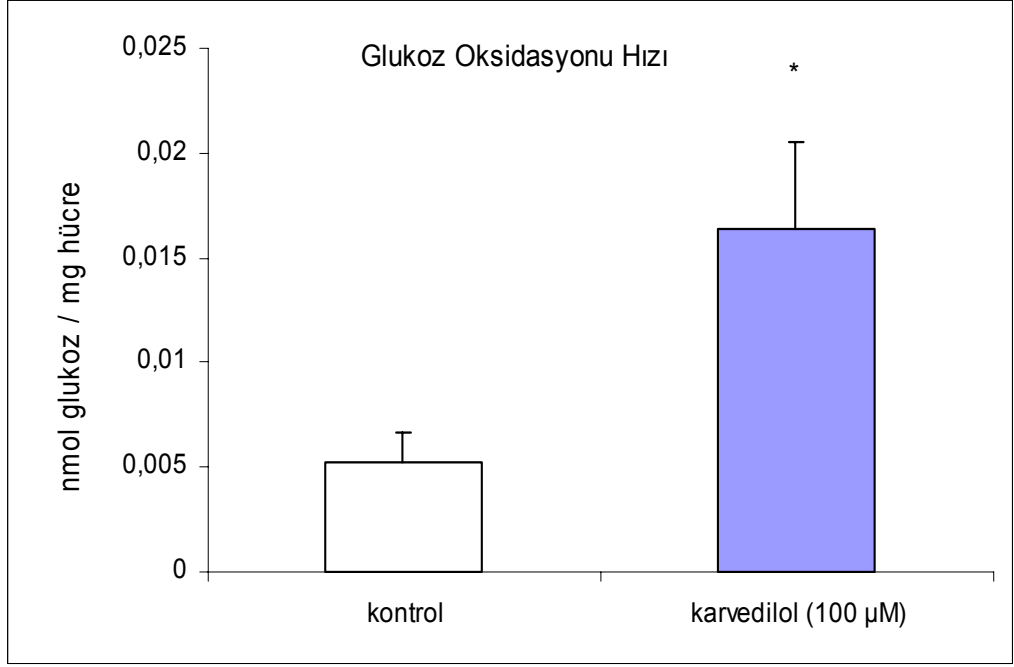
Bu deneyde; öncelikle hücreler, kontrol grubu ile karvedilol (β_{1-2} ve α_1 -bloker), prazosin (α_1 -bloker), adrenalin (adrenerjik agonist), karvedilol+ adrenalin ve prazosin+adrenalin eklenen gruplara ayrıldı (n=4).

Şekil 3.2'de gösterildiği üzere, 100µM karvedilol eklenen flasklarda, kontrol ile karşılaştırıldığında, glikoliz hızı yaklaşık olarak %50 oranında artmıştır. 100µM prazosin eklenen flasklarda da benzer bir etki gözlemlenmiştir. Bu iki sonuç, 1µM adrenalin eklenerek stimüle edilen hücrelerle elde edilen sonuçlara çok yakındır.

Ancak, adrenalinin etkisine benzer şekilde, karvedilol ile prazosin glikoliz hızını artırırken; adrenalin varlığında tekrarlanan deneylerde, prazosin ya da karvedilol glikoliz hızını daha fazla arttırmadı.

3.5. Glukoz oksidasyonu hızı

Yapılan ön denemelerde, glikoliz hızı deneyine benzer şekilde, glukoz oksidasyonu hızı deneyi için de 2 saatlik inkübasyon süresinin yeterli olduğuna karar verildi.



Şekil-3.3. Karvedilol varlığında glukoz oksidasyonu hızı
*vs kontrol, $p < 0,05$ ve $n = 4-7$

100µM karvedilol eklenen flasklar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, glukoz oksidasyonu hızında %100'den fazla artış gözlemlendi (Şekil-3.3).

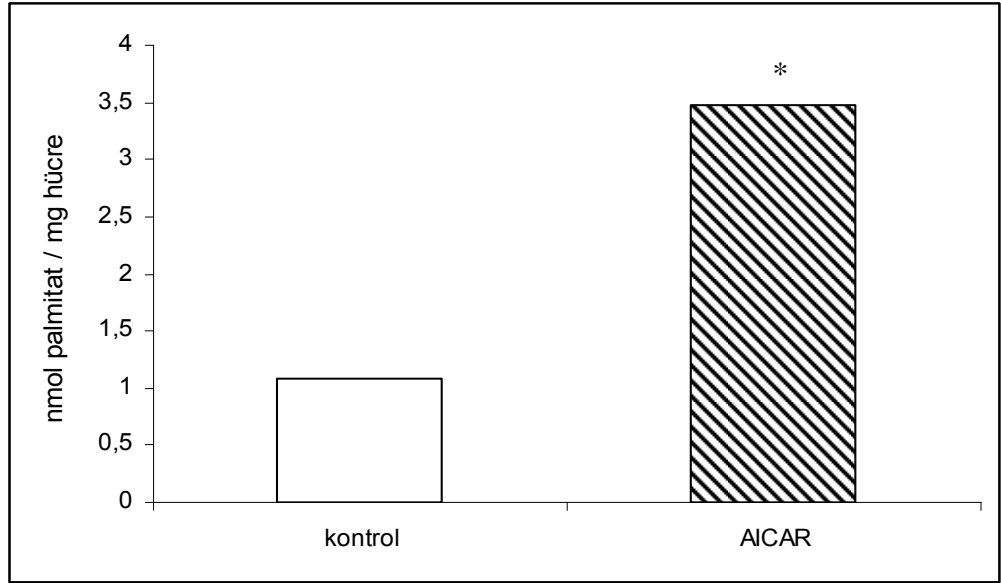
Glikoliz deneylerinden elde edilen sonuçlar ile birlikte değerlendirildiğinde, karvedilolun genel olarak glukoz metabolizmasını hızlandırdığı ve hücrelerde glukoz kullanımını artırdığı sonucuna ulaşılmaktadır.

3.6. Palmitik asit oksidasyonu hızı

3.6.1. AICAR ile palmitik asit oksidasyonu hızının indüklenmesi

Ön denemelerdeki sonuçlardan yola çıkarak, glukoz metabolizması deneylerindeki benzer şekilde, yağ asidi oksidasyonu deneyi için de 2 saatlik inkübasyon süresinin yeterli olduğuna karar verildi.

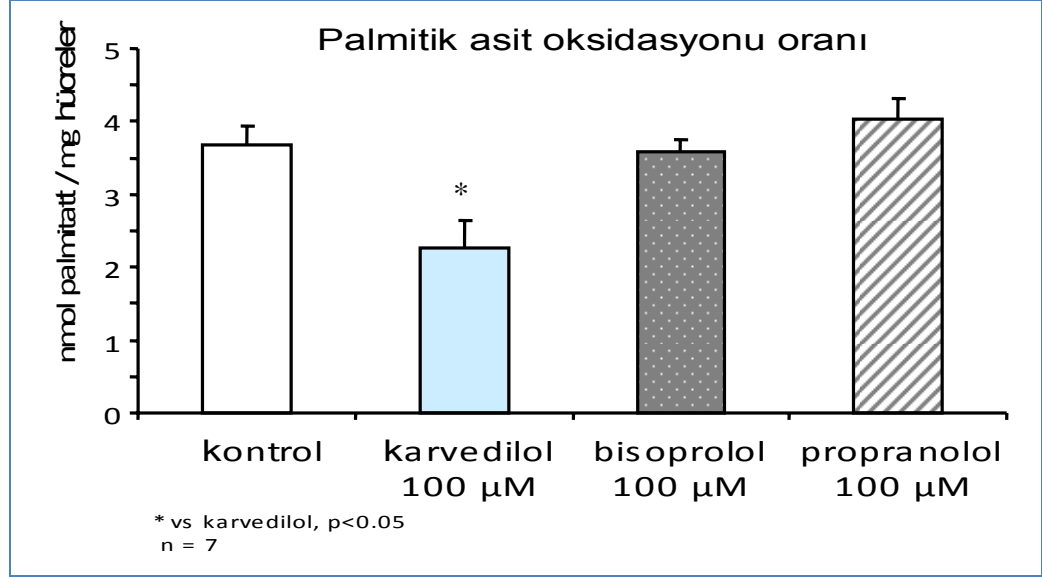
AICAR, AMPK aktivitesini ve yağ asidi oksidasyonu hızını artırdığı bilinen bir ajandır ve çalışmanın ön denemelerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Corton ve ark., 1995).



Şekil-3.4. AICAR eklenerek indüklenen yağ asidi oksidasyonu (n=3-4)

Öngörülen şekilde, 1mM konsantrasyonunda AICAR eklenip, 24 saatlik inkübasyona bırakılan hücrelerde palmitik asit oksidasyon oranında artış olmuştur (Şekil-3.4).

3.6.2. Karvedilol, bisoprolol ve propranolol için palmitik asit oksidasyonu hızlarının karşılaştırılması

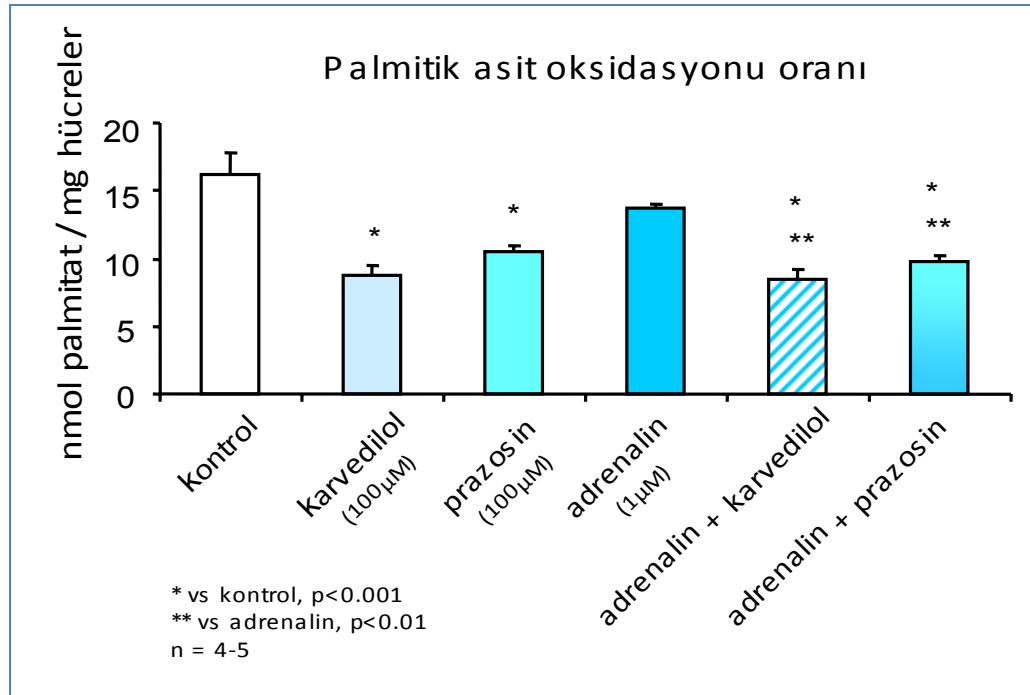


Şekil- 3.5. Karvedilol, bisoprolol ve propranolol için palmitik asit oksidasyonu hızları

Palmitik asit oksidasyonu hızında gerçekleştirdikleri değişiklik için sırasıyla 1, 2 ve 3. kuşak β -blokerler olan propranolol (β_{1-2} bloker), bisoprolol (β_1 bloker) ve karvedilolü (β_{1-2} ve α_1 bloker) karşılaştırmak üzere yaptığımız deneylerde, 4 gruba ayırdığımız flasklara 100µM konsantrasyonda ilaç ekledik.

100µM konsantrasyonlarda bisoprolol ve propranolol ile kontrol gruplarına kıyasla, karvedilol grubu palmitik asit oksidasyonunu anlamlı şekilde yaklaşık %50 oranında azaltmıştır (Şekil-3.5).

3.6.3. Adrenalin stimülasyonu varlığında palmitik asit oksidasyonu



Şekil- 3.6. α -bloker, β -bloker varlığında ve adrenalin stimülasyonu ile palmitik asit oksidasyonu hızındaki değişiklikler

100µM konsantrasyonda prazosin, 100µM konsantrasyonda karvedilol eklediğimiz gruplar ve artmış sempatik sinir sistemi aktivasyonunu taklit etmek amacıyla adrenalin eklenen gruplar ile deneyler tekrarlandı.

Şekil-3.6'da gösterildiği gibi, tek başlarına 100µM konsantrasyonda prazosin (α_1 bloker) ve 100µM konsantrasyonda karvedilol (β_{1-2} ve α_1 bloker) birbirine benzer şekilde palmitik asit oksidasyonunu %50 kadar azaltmıştır.

1µM konsantrasyonda hücrelerin mediumlarına eklenen adrenalin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında palmitik asit oksidasyonu hızını anlamlı şekilde artırmamıştır. Ancak; adrenalin ile birlikte karvedilol ve prazosin eklenen hücrelerde palmitik asit oksidasyonunu ise yine anlamlı olarak azaltmıştır.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada pek çok kalp hastalığında yaygın olarak kullanılan çeşitli β -blokerlerin, enerji eldesinde aracı metabolik yolları nasıl etkilediği hücre kültüründe incelenmiştir.

Araştırmalarda, pek çok β -blokerin kalp yetmezliği tablosunu düzeltirken, insülin rezistansını ve diyabet oluşumunu artırdıkları gösterilmiştir (Pollare ve ark.,1989 (a) ve (b); Lithell ve ark., 1992; Samuelsson ve ark., 1994; Gres ve ark., 2000). Ancak 3. kuşak bir β -bloker olan karvedilolün tam tersi etkilerle, serum lipid profilini düzelterek ve dokuda insülin duyarlılığını artırarak diğer β -bloker ilaçlara üstün olduğu kanıtlanmıştır (Oberhaensli ve ark., 1985; Jacob ve ark. 1996; Bell, 2004; Al-Hesayen, 2005; COMET, 2005). Ancak, karvedilolün diğer β -bloker ilaçlara bu üstünlüğünün nedeni tam olarak bilinmemekle beraber; insülin duyarlılığını artırmak ve serum lipid profilini düzeltmek şeklinde metabolik değişikliklere yol açması, enerji eldesinde yakıt olarak kullanılacak substrat seçimini değiştirebileceğini düşündürmektedir. Substrat seçimi ise, özellikle yetmezlik durumunda kısıtlı oksijenlenen kalpte, etkin enerji eldesinde çok kritik bir rol oynamaktadır (Stanley ve ark., 1997, Ashrafian ve ark., 2007).

Karvedilolün ve kıyaslamak için diğer α - ve β -bloker ilaçların substrat metabolizmasında gerçekleştirdikleri değişiklikleri gözlemek üzere deneylerimizi tamamladık ve karvedilolün, hipotezimiz doğrultusunda, kalpte glukoz kullanımını artırırken, yağ asidi kullanımını azalttığı sonucuna ulaştık. Yağ asidi kullanımındaki düşüş ile glukoz kullanımındaki artış oranlarının aynı olması, karvedilolün gerçekten de enerji eldesinde kullanılan substratı değiştirdiğini düşündürmektedir. Deneylerimizde kullanılan, sırasıyla, 1. ve 2. kuşak diğer β -blokerler propranolol ve bisoprolol varlığında benzer değişikliklerin gözlenmemesi; karvedilolün bu etkilerini α -adrenerjik reseptör blokajı üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmüştür. α -bloker prazosin ile

tekrar edilen deneylerde, karvedilol ile benzer sonuçlara ulaşılması da bu olasılığı kuvvetlendirmektedir.

Denelerimiz kapsamında glukoz metabolizması üzerinde yapılan ölçümler, radyoaktivite sayımlarını gerçekleştirdiğimiz Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı bünyesindeki sintilasyon cihazının bozulması (ve hala tamir edilememesi) nedeniyle glukoz oksidasyonu ölçümü sonuçlarını ayrıntılı bir şekilde içermemektedir.

Oksidasyona uğramak için glukoz ve yağ asitleri arasında metabolize olmak üzere bir yarışma vardır (Randle ve ark., 1963). Fizyolojik bir fonksiyonun yerine getirilmesi için belli bir miktarda enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır ve bu enerjinin eldesi için yakıt olarak hangi substratların, ne kadar kullanılacağı değişkenlik gösterebilir. Randle Döngüsü ile de açıklandığı gibi, enerji eldesinde yağ asidi veya glukoz oksidasyonunun katkıları birbirine bağlıdır (Hue ve Taegtmeyer, 2009; Randle, 1998). Bu düzenlemede, fizyolojik veya patolojik (iskemi veya diyabet gibi nedenlerle) koşulların yarattığı değişikliklerin etkisi olabilmekle birlikte, farmakolojik (trimetazidin, ranolazin gibi ilaçların glukoz kullanımını artırıcı etkileri gibi) olarak da modifiye edilebilir. Çalışmalarımızın sonuçlarına göre, yağ asidi kullanımındaki düşüş ve glukoz kullanımındaki artışın, birbirine çok yakın (yaklaşık %50) olması; karvedilolün bu etkisini hücrelerin substrat kullanımını değiştirerek gerçekleştirdiğine işaret etmektedir. Ancak sadece bu deney sonuçlarına dayanarak bunu kesin olarak söyleyebilmemiz iki nedenle mümkün değildir. Bunlardan birincisi; hücre kültürü yöntemi, metabolik ölçümlerin gerçekleştirilmesi için çok uygun olmakla beraber, kalp fonksiyonlarını değerlendirmeye olanak sağlamamaktadır. Bu nedenle, hücre kültüründe elde edilen bulguların, kalp fonksiyonlarının da izlenmesine olanak sağlayan izole kalp preparatlarında gerçekleştirilen metabolik ölçümlerin sonuçları ile karşılaştırılarak tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir. İkincisi ise; çalışmamızda hücrelerdeki endojen kaynakların enerji eldesindeki kullanımları değerlendirilmemiştir. Metabolik ölçümler,

flasklardaki mediu mlara dışarıdan eklenen işaretli glukoz veya palmitik asit kullanımı üzerinden gerçekleştirilmiş, ancak hücrede depo halde bulunan (glikojen veya triaçilgliserol) kaynakların katkısı değerlendirilmemiştir.

Dene ylerin bir kısmı, kalp yetmezliği tablosunda görülen aşırı sempatik sistem aktivasyonu nedeniyle çok miktarda katekolamin varlığı taklit edilerek gerçekleştirildi. Kalp fonksiyonunu stimüle etmesi nedeniyle, adrenalinin aynı zamanda substrat kullanımını da artırması beklenmekteydi ve glukoz kullanımını artırdı. Ancak, tek başlarına glukoz kullanımını artıran karvedilol ve prazosin, adrenal in varlığında bu oranı daha fazla artırmadılar. Adrenalin ile inkübasyon palmitik asit oksidasyonu hızını ise değiştirmed i. Buna karşılık, adrenal in varlığında karvedilol ve prazosin ile gerçekleştirilen deneylerde ise yağ asidi oksidasyonu hızının azaldığı sonucuna ulaşıldı.

Adrenalin hem α -, hem de β -adrenerjik reseptörleri aktivasyonu üzerinden kalp fonksiyonunu stimüle etmektedir. Bu aktivasyonun, kalbe gereksinim duyduğu enerjiyi öncelikle glukoz kullanımından sağladığını ve β -blokerler aracılığıyla bu reseptörlerin bloke edilmesinin hücreye glukoz girişini engelleyerek inslin rezistansı gelişmesine neden olduğunu; karvedilolün olumlu etkilerinin ise α -adrenerjik reseptör aracılı etkilerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karvedilol, hücre kültüründe yapılan ölçümlerde palmitik asit kullanımını azalttığı oranda, glukoz kullanımını artırmıştır. Kalp yetmezliği tablosunda görülen aşırı sempatik sinir sistemi aktivasyonunun taklit edildiği koşullar altında da palmitik asit kullanımını azaltırken, glukoz kullanımını artırmıştır. Diğer α - ve β -blokerler ile karşılaştırıldığında, propranolol ve bisoprololün böyle bir etkisi bulunmamışken; α -bloker prazosin, karvedilol ile benzer sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.

Karvedilol olumlu etkilerini, α_1 -adrenerjik reseptör blokajı aracılığıyla metabolizmayı daha etkin enerji eldesi için glukoz kullanımını artırmak yönünde değiştirerek göstermektedir.

Metabolik ölçümler, kalp fonksiyonlarının ve hücrelerdeki endojen kaynakların enerji eldesindeki paylarının da değerlendirilebilmesi adına izole kalp preparatlarında tekrar edilmelidir.

ÖZET

Bu çalışmada, karvedilol başka β -bloker (propranolol ve bisoprolol) ve α -bloker (prazosin) ilaçlar ile karşılaştırılarak, miyosit hücre kültüründe metabolik yollarda kullanılan substratlar incelenmiş; ayrıca çalışmalar adrenalin varlığında tekrar edilip, kalp yetmezliği tablosundaki gözlemlenen aşırı sempatik sinir sistemi aktivasyonu taklit edilerek sonuçlar tekrar değerlendirilmiştir.

Hücrelerin sağlıklı çoğalması, miyotüp formuna dönüşümlerinin sağlanması ve dinlenme halindeki hücrelerde validasyon deneylerinin tamamlanmasının ardından metabolik ölçümlere geçilmiştir.

Karvedilol (β_{1-2} ve α_1 bloker) için glikoliz hızı ölçümünde; $10^{-6}M$, $10^{-5}M$ ve $10^{-4}M$ konsantrasyonlarda çalışılmış ve karvedilol, doza bağlı olarak glikoliz hızını artırmıştır.

100 μ M konsantrasyonda karvedilol, glikoliz hızını anlamlı şekilde yaklaşık %50 oranında artırmıştır. 100 μ M konsantrasyonda prazosin (α_1 bloker) ve 1 μ M konsantrasyonda adrenalin de benzer şekilde glikoliz hızını %50 oranında artırmıştır. Adrenalin ile birlikte prazosin ya da karvedilol glikoliz hızını daha fazla artırmamıştır.

100 μ M konsantrasyonda karvedilol eklenen flasklar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, glukoz oksidasyonu hızı %100'den fazla artmıştır.

Yağ asidi oksidasyonu hızını artırdığı kesin olarak bilinen AICAR 1mM konsantrasyonda beklendiği gibi palmitik asit oksidasyonu hızını artırmıştır.

Propranolol (β_{1-2} bloker), bisoprolol (β_1 bloker) ve karvedilol (β_{1-2} ve α_1 bloker) 100 μ M konsantrasyonda karşılaştırılmış; bisoprolol ve propranolol ile kontrol gruplarına kıyasla, karvedilol grubu palmitik asit oksidasyonu hızını %50 oranında azaltmıştır.

100 μ M konsantrasyonda prazosin ve 100 μ M konsantrasyonda karvedilol birbirine benzer şekilde palmitik asit oksidasyonunu %50 kadar azaltmıştır. 1 μ M

konsantrasyonda adrenalin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında palmitik asit oksidasyonu hızını anlamlı şekilde artırmamıştır. Ancak; adrenalin ile birlikte karvedilol ve prazosin eklenen hücrelerde ise palmitik asit oksidasyonu hızı yine anlamlı olarak azalmıştır.

Karvedilolün diğer β -blokerlerden farklı şekilde ve α_1 bloker prazosine benzer şekilde glukoz kullanımını artırıp, yağ asidi kullanımını azaltması bu etkilerin α_1 -adrenerjik reseptör blokajı üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: karvedilol, miyokard substrat metabolizması, metabolik terapi, kalp yetmezliği

SUMMARY

The effects of β -blockers on substrate metabolism of heart in myocyte cell culture

In this study, direct metabolic effects of carvedilol, propranolol and bisoprolol were investigated. Similar to hyperactivity of the sympathetic nervous system and high catecholamine concentrations in failing heart, experiments are repeated with adrenaline and results reassessed.

Metabolic measurements are performed after achieving healthy proliferation of myocytes, differentiation to myotubes and completion of the validation studies.

Addition of carvedilol to flasks at 10^{-6} M, 10^{-5} M and 10^{-4} M concentrations, resulted in dose-dependent increase of glycolysis.

At 100μ M concentration carvedilol increased the glycolysis by 50%, significantly. Similar to carvedilol, at 100μ M concentration prazosine (α_1 blocker) and at 1μ M concentration adrenalin increased the glycolysis by 50%. Prazosine and carvedilol did not increase glycolytic rate any further in the presence of adrenalin.

Carvedilol stimulated glucose oxidation more than 100%, at 100μ M concentration.

AICAR, a known activator of fatty acid oxidation, increased palmitic acid oxidation.

The effects of propranolol, bisoprolol and carvedilol on palmitate oxidation were compared. Carvedilol decreased palmitic acid oxidation by 50%, however neither propranolol nor bisoprolol had an effect on palmitate oxidation.

Carvedilol and prazosine, at 100μ M concentrations, significantly decreased the rate of palmitic acid oxidation by 50%. At 1μ M concentration adrenalin did not

alter palmitate oxidation. However in the presence of adrenalin, carvedilol and prazosine significantly decreased palmitic acid oxidation.

The effects of carvedilol on substrate metabolism, which are similar to the effects of α blocker prazosine, seem to be related to the blockade of α_1 adrenergic receptors.

Key words: carvedilol, myocard substrate metabolism, metabolic therapy, heart failure

KAYNAKLAR

- AL-HESAYEN A., AZEVEDO E.R., FLORAS J.S., HOLLINGSHEAD S., LOPASCHUK G.D., PARKER J.D. (2005). Selective versus nonselective beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure: differential effects on myocardial energy substrate utilization. *Eur J Heart Fail.* **7(4)**: 618-623
- AUGUSTUS A.S., KAKO Y., YAGYU H., AND GOLDBERG I.J. (2003). Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E331–E339
- BELL D.S. (2004). Advantages of a third-generation beta-blocker in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2004 May 6;**93(9A)**:49B-52B
- BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- CHAVEZ P.N., STANLEY W.C., McELFRESH T.A., HUANG H., STERK J.P., AND CHANDLER M.P. (2003). Effects of hyperglycemia and fatty acid oxidation inhibition during aerobic conditions and demand-induced ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* H1521–H1527
- CIBIS-II INVESTIGATORS AND COMMITTEES. (1999). The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* **353**: 9–13
- CORTON J.M., GILLESPIE J.G., HAWLEY S.A., HARDIE D.G. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem.* 1995 Apr 15;**229(2)**:558-65
- COVEN D.L., HU X., CONG L., BERGERON R., SHULMAN G.I., HARDIE D.G., AND YOUNG L.H. (2003). Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**: E629–E636
- CRASS M.F. III, SHIPP J.C., AND PIEPER G.M. (1975). Effects of catecholamines on myocardial endogenous substrates and contractility. *Am J Physiol* **228**: 618–627
- DIMOPOULOS N., WATSON M., GREEN C., HUNDAL H.S. (2007). The PPARdelta agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells. *FEBS Lett.* 2007 **581(24)**: 4743-8
- DYCK J.R. AND LOPASCHUK G.D. (2002) Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol* **34**: 1099–1109
- DYCK J.R., CHENG J.F., STANLEY W.C., BARR R., CHANDLER M.P., BROWN S., WALLACE D., ARRHENIUS T., HARMON C., YANG G., NADZAN A.M., AND LOPASCHUK G.D. (2004). Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation. *Circ Res* **94**: e78–e84
- GOODWIN G.W., TAYLOR C.S., AND TAEGTMEYER H. (1998). Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work. *J Biol Chem* **273**: 29530–29539
- GRESS T.W., NIETO F.J., SHAHAR E., WOFFORD M.R., BRANCATI F.L. (2000). Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *N Engl J Med* **342**: 905-912
- HUE L., TAEGTMEYER H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **297**:578-591

- HUGHES S.D., QUADE C., JOHNSON J.H., FERBER S., NEWGARD C.B. (1993). Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. Relationship to glucose metabolism. *J Biol Chem*. **268**:15205-15212
- INGWALL J.S., WEISS R.G. (2004). Is the Failing Heart Energy Starved? On Using Chemical Energy to Support Cardiac Function. *Circ Res*. 2004;**95**:135-145
- JACOB S., RETT K., WICKLMAYR M., AGRAWAL B., AUGUSTIN H.J., DIETZE G.J. (1996). Differential effect of chronic treatment with two beta-blocking agents on insulin sensitivity: the carvedilol-metoprolol study. *J Hypertens* **14**: 489-494
- KATZ (2006). Physiology of The Heart, 4th Edition, Chapter 16.
- KINTAKA T., TANAKA T., IMAI M., ADACHI I., NARABAYASHI I., AND KITAURA Y. (2002). CD36 genotype and long-chain fatty acid uptake in the heart. *Circ J* **66**: 819–825
- KOPECKY S.L. (2006). Effect of Beta Blockers, Particularly Carvedilol, on Reducing the Risk of Events After Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol* ; **98**:1115–1119
- LIPPINCOTT'S ILLUSTRATED REVIEWS Biyokimya. (1997). 2. Baskı, 17. Bölüm
- 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
- LOPASCHUK G.D., BELKE D.D., GAMBLE J., ITOI T., AND SCHONEKESS B.O. (1994). Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1213**: 263–276
- LOPASCHUK G.D., USSHER J.R., FOLMES C.D.L., JASWAL J.S., AND STANLEY W.C. (2010). Myocardial Fatty Acid Metabolism In Health And Disease. *Physiol Rev* **90**: 207–258
- LUIKEN J.J., WILLEMS J., VAN DER VUSSE G.J., AND GLATZ J.F. (2001). Electrostimulation enhances FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake by isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**: E704–E712
- LUIKEN J.J., COORT S.L., KOONEN D.P., VAN DER HORST D.J., BONEN A., ZORZANO A., AND GLATZ J.F. (2004). Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflügers Arch* **448**: 1–15
- MARSIN A.S., BERTRAND L., RIDER M.H., DEPRez J., BEAULOYE C., VINCENT M.F., VAN DEN B.G., CARLING D., AND HUE L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* **10**: 1247–1255
- MCGARRY J.D. AND BROWN N.F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* **244**: 1–14
- MERIT-HF. (1999). Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* **353**: 2001–2007
- OBERHAENSLI R.D., SCHWENDIMANN R., KELLER U. (1985). Effect of norepinephrine on ketogenesis, fatty acid oxidation, and esterification in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* **34**:774-779
- OPIE L.H. (1991). The Heart: Physiology and Metabolism. New York: Raven
- OPIE L.H., LOPASCHUK G.D. Fuels: Aerobic and Anaerobic Metabolism. Heart: Physiology and Pathophysiology 4th Edition, 2004
- PACKER M., BRISTOW M.R., COHN J.N., COLUCCI W.S., FOWLER M.B., GILBERT E.M., SHUSTERMAN N.H. (1996). The effect of carvedilol on

- morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med*. **334**:1349-1355
- PACKER M., COATS A.J., FOWLER M.B., KATUS H.A., KRUM H., MOHACSI P., ROULEAU J.L., TENDERA M., CASTAIGNE A., ROECKER E.B., SCHULTZ M.K., DEMETS D.L.; Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. (2001). Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* **344**: 1651-1658
- PACKER M., FOWLER M.B., ROECKER E.B., COATS A.J., KATUS H.A., KRUM H., MOHACSI P., ROULEAU J.L., TENDERA M., STAIGER C., HOLCZLAW T.L., AMANN-ZALAN I., DEMETS D.L. (2002). Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* **106**: 2194–2199
- PERDOMO G., COMMERFORD S.R., RICHARD A.M., ADAMS S.H., CORKEY B.E., O'DOHERTY R.M., BROWN N.F. (2004). Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* **279**: 27177-27186
- POLLARE T., LITHELL H., MORLIN C., PRANTARE H., HVARFNER A., LJUNGHALL S. (1989). Metabolic effects of diltiazem and atenolol: results from a randomized, double-blind study with parallel groups. *J Hypertens* **7**:551-559, 1989. (a)
- 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**:1152-1157, 1989. (b)
- POOLE-WILSON P.A., CLELAND J.G., Di LENARDA A., HANRATH P., KOMAJDA M., METRA M., REMME W.J., SWEDBERG K., TORP-PEDERSEN C. (2002). Rationale and design of the carvedilol or metoprolol European trial in patients with chronic heart failure: COMET. *Eur J Heart Fail* **4**: 321-329
- POOLE-WILSON P.A., SWEDBERG K., CLELAND J.G., Di LENARDA A., HANRATH P., KOMAJDA M., LUBSEN J., LUTIGER B., METRA M., REMME W.J., TORP-PEDERSEN C., SCHERHAG A, SKENE A; Carvedilol Or Metoprolol European Trial Investigators. (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
- RANDLE P.J., GARLAND P.B., HALES C.N., NEWSHOLME E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**:785–789
- RANDLE P.J. AND PRIESMAN D.A. (1996). Short term and longer term regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. In: Alpha-keto Acid Dehydrogenase Complexes. *Basel: Birkhauser Verlag*, 1996, p. 151–161.
- RANDLE P.J. (1998). Regulatory Interactions between Lipids and Carbohydrates: The Glucose Fatty Acid Cycle After 35 Years. *Diabetes Metab. Rev.* **14**, 263–283
- RESZKO A.E., KASUMOV T., DAVID F., JOBBINS K.A., THOMAS K.R., HOPPEL C.L., BRUNENGRABER H., and des ROSIERS C. (2004). Peroxisomal fatty acid oxidation is a substantial source of the acetyl moiety of malonyl-CoA in rat heart. *J Biol Chem* **279**: 19574–19579
- ROBINSON I.N. AND ZAMMIT V.A. (1982) Sensitivity of carnitine acyltransferase I to malonyl-CoA inhibition in isolated rat liver mitochondria is quantitatively

- related to hepatic malonyl-CoA concentration in vivo. *Biochem. J.* **206**, 177-179
- RUSSELL R.R., III, BERGERON R., SHULMAN G.I., AND YOUNG L.H. (1999). Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **277**: H643–H649
- SACK M.N., RADER T.A., PARK S., BASTIN J., MCCUNE S.A., KELLY D.P. (1996). Fatty Acid Oxidation Enzyme Gene Expression Is Downregulated in the Failing Heart. *Circulation*. 1996;**94**:2837-2842
- SACK M.N., HARRINGTON L.S., JONASSEN A.K., MJOS O.D., YELLON D.M. (2000). Coordinate regulation of metabolic enzyme encoding genes during cardiac development and following carvedilol therapy in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Drugs Ther* **14**:31-39
- SAMBANDAM N., LOPASCHUK G.D., BROWNSEY R.W., ALLARD M.F. (2002). Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev.* 2002 Apr;**7**(2):161-73
- SAMUELSSON O., HEDNER T., BERGLUND G., PERSSON B., ANDERSSON O.K., 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**:257-263
- SCHAFFER J.E. (2002). Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**: E239–E246
- SHARMA N., OKERE I.C., MCELFFRESH T.A., KING K.L., STERK J.P., HUANG H., BRUNENGRABER D.Z., CHANDLER M.P., AND STANLEY W.C. (2004). Regulation of glucose oxidation and pyruvate dehydrogenase activity during high cardiac energy expenditure: critical role for fatty acid oxidation. *J Physiol* **562**: 593–603
- STANLEY W.C., LOPASCHUK G.D., AND MCCORMACK J.G. (1997). Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* **34**: 25–33
- STANLEY W.C., LOPASCHUK G.D., HALL J.L., MCCORMACK J.G. (1997). Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* **33**: 243-257
- STANLEY W.C., RECCHIA F.A., LOPASCHUK G.D. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiol Rev* **85**:1093-1129
- STARK B., KELLER U. (1987). Alpha 1-adrenergic stimulation of ketogenesis and fatty acid oxidation is associated with inhibition of lipogenesis in rat hepatocytes. *Experientia*. 1987 Oct 15;**43**(10):1104-6
- SWEDBERG K., HJALMARSON A., WAAGSTEIN F., WALLENTIN I. (1979). Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade. *Lancet* **1**:1374-1376
- TORP-PEDERSEN C., POOLE-WILSON P.A., SWEDBERG K., CLELAND J.G., Di LENARDA A., HANRATH P., KOMAJDA M., LUTIGER B., METRA M., REMME W.J., SCHERHAG A., SKENE A.; COMET Investigators. (2005). Effects of metoprolol and carvedilol on cause-specific mortality and morbidity in patients with chronic heart failure--COMET. *Am Heart J* **149**: 370-376
- VAN BILSEN M., VAN DER VUSSE G.J., RENEMAN R.S. (1998). Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism. *Pflugers Arch.* 1998 Dec;**437**(1):2-14. Review

- VAN DER VUSSE G.J., VAN BILSEN M., AND GLATZ J.F. (2000). Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res* **45**: 279–293
- WAAGSTEIN F., HJALMARSON A., VARNAUSKAS E., WALLENTIN I. (1975). Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J.* **37**:1022-1036
- WALLHAUS T.R., TAYLOR M., DEGRADO T.R., RUSSELL D.C., STANKO P., NICKLES R.J. AND STONE C.K. (2001). Myocardial Free Fatty Acid and Glucose Use After Carvedilol Treatment in Patients With Congestive Heart Failure. *Circulation* **103**:2441-2446
- WISNESKI J.A., GERTZ E.W., NEESE R.A., GRUENKE L.D., MORRIS D.L., CRAIG J.C. Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. *J Clin Invest* **76**: 1819–1827, 1985.
- WISNESKI J.A., GERTZ E.W., NEESE R.A., AND MAYR M. (1987). Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with ¹⁴C-labeled substrates in humans. *J Clin Invest* **79**: 359–366
- YAFFE D., SAXEL O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977 Dec 22-29;**270(5639)**:725-7

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Elif
Soyadı: Süzmeçelik
Doğum Yeri ve Tarihi: Turgutlu, Manisa - 02.01.1986
Uyruğu: T.C.
Medeni Durumu: Bekar
İletişim Adresi: Kazakistan Caddesi No:22/1 Emek/Ankara
Telefon: 05053877034
Eğitimi: 2009 Şubat-Haziran Università' di Parma
Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale
2003-2007 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
2000-2003 Turgutlu Halil Kale Fen Lisesi
1996-2000 Turgutlu Anadolu Lisesi
1991-1996 Turgutlu Cumhuriyet İlköğretim Okulu
Yabancı Dili: İngilizce, İtalyanca