



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM
DALI



**KALP YETMEZLİKLİ KÖPEKLERDE SERUM PROTEOMİK
PROFİLİ İLE YENİ BİYOBELİRTEÇLERİN
İDENTİFİKASYONU**

AHMET SARIL

ORCID ID : 0000-0003-1094-880X

DOKTORA TEZİ

BURSA-2021





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**KALP YETMEZLİKLİ KÖPEKLERDE SERUM PROTEOMİK
PROFİLİ İLE YENİ BİYOBELİRTEÇLERİN İDENTİFİKASYONU**

AHMET SARIL

ORCID ID : 0000-0003-1094-880X

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Zeki YILMAZ

**OUAP(V)-2018/12 – BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ BİRİMİ
BURSA-2021**

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“Kalp yetmezlikli köpeklerde serum proteomik profili ile yeni biyobelirteçlerin identifikasyonu” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.


Ahmet SARIL
22/01/2021

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

29/12/2020

Adı Soyadı: Ahmet SARIL

Anabilim Dalı: İç Hastalıkları

Tez Konusu: Kalp yetmezlikli köpeklerde serum proteomik profili ile yeni biyobelirteçlerin identifikasyonu

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Zeki YILMAZ

İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK

İÇ KAPAK

ETİK BEYANI.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kardiyak Anatomi ve Fizyoloji.....	4
2.2. Kalp Yetmezliği.....	5
2.2.1. Tanım.....	5
2.2.2. Etiyoloji.....	6
2.2.3. Patofizyoloji.....	7
2.2.3.1.Nörohormonal Mekanizma.....	8
2.2.3.2.Sentral Sinir Sistemi Etkisi.....	9
2.2.3.3.RAAS Etkisi.....	11
2.2.3.4.Sitokin Etkisi.....	12
2.2.4. Oksidatif Stres.....	15
2.2.5. Kalp Yetmezliklerinin Sınıflandırılması.....	17
2.3. Kalp Yetmezliklerinin Tanısı.....	19
2.3.1. Anamnez ve Signalement.....	19
2.3.2. Fiziksel Muayene.....	20
2.3.3. Toraks Görüntüleme.....	22
2.3.4. Elektrokardiyografi (EKG).....	23
2.3.5. Kardiyak Biyobelirteçler.....	24
2.4. Proteomik.....	27
2.5. Kalp Yetmezliği Tedavisi.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Hayvan Materyali ve Gruplar.....	35
3.2. Olguların Seçimi.....	35
3.3. Çalışmadan Çıkarma Kriterleri.....	37
3.4. Örneklerin Toplanması.....	38
3.4.1. Klinik Muayene.....	38
3.4.2. Radyolojik Muayene.....	38
3.4.3. Elektrokardiyografik Muayene.....	38
3.4.4. Ekokardiyografik Muayene.....	40
3.4.5. Non-invazif Tansiyon Ölçümü.....	47

3.4.6. Laboratuvar Analizleri.....	48
3.4.6.1. Hematoloji.....	48
3.4.6.2. Serum Biyokimyasal Analizler.....	48
3.4.7. İnflamatuvar Belirteçler.....	48
3.4.7.1. Serum Sitokin Analizleri.....	48
3.4.7.2. Akut Faz Proteinleri.....	50
3.4.7.3. Oksidatif Stres Belirteçleri.....	50
3.4.7.4. Paranoksanaz 1 ve Butirilkolinesteraz Aktivitesi.....	50
3.4.8. Proteomik Analizler.....	51
3.4.9. Örneklerin Saklanması.....	52
3.4.10. İstatistiksel Analizler.....	52
4. BULGULAR.....	54
4.1. Klinik Bulgular.....	55
4.2. Radyolojik Bulgular.....	57
4.3. EKG Bulguları.....	58
4.4. Ekokardiyografik Bulgular.....	59
4.5. Laboratuvar Bulguları.....	63
4.5.1. Hematoloji.....	63
4.5.2. Serum Biyokimyasal Bulgular.....	64
4.5.3. Serum Sitokin Bulguları.....	68
4.5.4. Serum Proteomik Bulguları.....	76
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	111
5.1. Kalp Yetmezliği ve Klinik Süreç.....	111
5.2. Kalp Yetmezliği ve Hemogram.....	118
5.3. Kalp Yetmezliği ve Organ-Doku Hasar Belirteçleri.....	119
5.4. Kalp Yetmezliği ve İnflamasyon.....	125
5.5. Kalp Yetmezliği ve Serum Proteomlarındaki Değişimler.....	131
5.5.1. B2 Sınıfı Protein İfade Farklılıkları.....	133
5.5.2. C Sınıfı Protein İfade Farklılıkları.....	136
5.5.3. D Sınıfı Protein İfade Farklılıkları.....	140
5.5.4. Tedavinin Serum Proteomlarına Etkisi.....	145
5.6. Çalışmayı Sınırlandıran Faktörler.....	146
5.7. Sonuç.....	147
6. KAYNAKLAR.....	149
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	170
8. EKLER.....	174
9. TEŞEKKÜR.....	179
10.ÖZGEÇMİŞ.....	180

TÜRKÇE ÖZET

Bu çalışmada doğal koşullarda ve farklı şiddetlerde kronik kalp yetmezliği (KKY) gelişen köpeklerde serum sitokin ve proteomik profilinin belirlenmesi, böylece tanısal ve hastalık sürecinin takip edilmesine olanak sağlayabilecek yeni biyobelirteçlerin identifikasyonu amaçlanmıştır.

Materyal olarak farklı ırk, yaş, vücut ağırlığı ve her iki cinsiyetten toplam 29 köpek kullanılmış ve bunlar Amerikan Veteriner İç Hastalıkları Koleji'ne (ACVIM) göre dört gruba ayrılmıştır: A grubu sağlıklı kontrolleri (n=8), B grubu asemptomatik (n=6), C grubu semptomatik (n=10) ve D grubu da standart tedaviye direnç gösteren KKY'li köpeklerden (n=5) oluşturulmuştur. Klinik ve laboratuvar muayeneleri tedavi öncesi ve sonrası yapılmıştır. Serum sitokin ve proteomları sırasıyla otomatik analizör (Luminex 200, TX) ve likid kromatografi kütle-spektrometri (LC/MS) ile belirlenmiştir.

C ve D gruplarında keratinosit kemotaktik (KC-like) sitokin düzeyi A ve B gruplarına göre önemli düzeyde artmıştır ($P < 0,05$). Grup A ve B'ye göre D grubunda serum C-reaktif protein (CRP) düzeyi daha yüksek ($P < 0,05$), serum oksidatif stres parametreleri ise daha düşük bulunmuştur ($P < 0,05$). Tedavi sonrası serum CRP, haptoglobin ve KC-like düzeyleri azalırken anti-oksidan kapasite göstergeleri yükselmiştir. Proteomik analizlerinde toplam 157 protein tespit edilmiş; bunların 29 adedi anlamlı (9 artan ve 20 azalan) değişim göstermiştir. Tedavi öncesi artan (angiotensinogen-AGT ve complement-C3) ve azalan proteinlerin bazıları (carboxypeptidase-CPN, actin cytoplasmic-1 ve immunoglobulin lambda-1 light chain) tedavi ile birlikte değişim göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile serum sitokin ve proteinlerinin köpeklerde KKY'nin tanımlanma ve sınıflandırılmasında katkılar sunabileceği, tedavi süreçlerinin bu sitokin (özellikle KC-like) ve proteomlarla (CPN, C3 ve AGT) izlenebileceği sonucuna varılmıştır. Bu biyobelirteçlerin klinik sürece aktarılabilmesi için validasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kalp yetmezliği, serum proteomik, köpek

İNGİLİZCE ÖZET

Identification of new biomarker by serum proteomic profile in dogs with heart failure

In this study, it was aimed to determine the serum cytokine and proteomic profile in different severities of naturally acquired chronic heart failure (CHF) in dogs, thereby providing the identification of new biomarkers enabling the diagnosis and follow-up of the disease process.

The materials used in this study were of a total of 29 dogs of different breed, age, body-weight and both sexes, and divided into four groups according to the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) consensus guidelines: Group A healthy controls (n=8), Group B asymptomatic (n=6), Group C symptomatic (n=10) and Group D dogs with CHF resistant to standard therapy (n=5). Clinical and laboratory examinations were performed before and after treatment. Serum cytokines and proteomes were determined by an automatic analyzer (Luminex 200, TX) and liquid chromatography mass-spectrometry (LC/MS), respectively.

The level of keratinocyte chemotactic-like (KC-like) cytokine in Groups C and D increased significantly compared to Group A and B ($P < 0.05$). Serum C-reactive protein (CRP) was higher but serum levels of oxidative stress parameters were lower in Group D than those of Group A and B ($P < 0.05$). Serum CRP, haptoglobin and KC-like levels were decreased but serum antioxidant capacity increased after treatment. A total of 157 proteins were detected by the proteomic analysis; 29 of them showed significant changes (9 up-regulated and 20 down-regulated). Some of these proteins (carboxypeptidase CPN, actin-cytoplasmic-1 and immunoglobulin lambda-1 light chain) showed the differences at statistically significant level after the treatment.

In conclusion, our results showed that serum cytokines and proteins could contribute to the diagnosis and classification of CHF, and these cytokines (especially KC-like) and proteomes (CPN, C3 and AGT) could be used in monitoring the course of the disease and effectiveness of treatment. Validation studies are needed to adapt these biomarkers to the clinical settings.

Keywords: Heart failure, serum proteomics, dog

1. GİRİŞ

İnsan ve küçük hayvan hekimliğinde kronik kalp yetmezliği (KKY) pratikte en sık karşılaşılan hastalıkların başında gelmekte, ileri yaşlarda da yüksek mortalite ile seyretmektedir. KKY'nin tanı ve patofizyolojisinin detaylandırılmasına olanak sağlayacak yeni proteinlerin bulunması ve saha koşullarına uygunluğu için çalışmalar yapılması; morbitide ve mortalite azalmasına, yaşam süresi ve kalitesinin yükselmesine, hatta ilaç masraflarından kaynaklanan ekonomik kayıpların önüne geçilmesine olanak sağlayacaktır.

KKY; öksürük, dispnö, halsizlik ve abdominal genişleme ile karakterize progresif klinik bir sendromdur (Ribeiro-Samora et al., 2017). Köpeklerde ve insanlarda miksamatoz mitral kapak hastalığı (MMVD) ve dilate kardiyomyopati (DCM) en yaygın edinsel kalp hastalıkları olup KKY ile sonuçlanmaktadır (Keene et al., 2019). MMVD'li hastalarda; mitral kapağın progresif miksamatoz dejenerasyonuna bağlı olarak mitral regürgitasyon ve sol kalp morfolojisinde değişim şekillenmektedir. DCM genellikle büyük ırk köpeklerde gözlenen genetik temelli bir kalp hastalığı olup öncelikle sistolik fonksiyondaki bozulma ile karakterizedir (Janus et al., 2016).

Her iki kalp hastalığı non-inflamatuvar olarak kabul edilseler de (Schulthesis et al., 2019) yapılan çalışmalar; MMVD ve DCM'ye bağlı KKY gelişen insan ve köpeklerde kan dolaşımında tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), C-reaktif protein (CRP) ve interlökinler (ILs) gibi inflamatuvar sitokinlerin arttığını göstermektedir (Petric, Lukman, Verk, & Svete, 2018; Vatkinov et al., 2019). İnsanlarda oksidatif stres artışı ile kardiyovaskular hastalık varlığı ve şiddeti arasında pozitif bir korelasyon gösterilmesine rağmen (Verk, Nemeč-Svete,

Salobir, Rezar, & Petric, 2017; Reimann et al., 2017), KKY'li köpeklerde total antioksidant kapasite ve bu kapasitenin inflamatuvar biyobelirteçler ve ekokardiyografik parametrelerle olan ilgisi henüz ortaya çıkartılmamıştır.

Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte detaylı serum protein analizleri (proteomik) yapılabilmekte; makro moleküler proteinlerin örneklerden uzaklaştırılması sonrası düşük moleküler ağırlıklı binlerle ifade edilen proteinlerin ortaya çıkartılmasına imkân sağlanmaktadır. Serum proteinlerinin sayısının çok fazla olduğu düşünüldüğünde bu proteinlerin hastalık ve sağlık durumunda üstlendiği görevlerin çeşitliliğinin görünenden fazla olduğu söylenebilir. Proteomik analiz sonuçlarının biyo-informatik yazılımlarla detaylandırılması; serum proteinleri arasındaki ilginin ortaya konmasına (protein – protein interaksiyonu), biyolojik, moleküler ve yolak (pathway) bilgilerinin belirlenmesine katkı sağlamaktadır (Stanley, Gundry, Cotter, & Van Eyk, 2004).

KKY; köpeklerde insanlardakine benzer olarak hastalık şiddetine göre kategorize edilmiştir. Son zamanlarda köpeklerde KKY için Amerikan Koleji Veteriner İç Hastalıkları (ACVIM) konseyi tarafından tavsiye edilen sınıflandırma kullanılmaktadır (Keene et al., 2019). Bu sınıflandırmaya göre KKY; sağlıklı ama predispoze ırkları kapsayan gruptan (A grubu), asemptomatik (B grubu) ve semptomatik hasta gruplarına (C ve D grupları) göre kategorize edilmektedir. Bu sınıflandırmanın yapılabilmesi için görsel tanı tekniklerine (röntgen ve ekokardiyografi) ihtiyaç kaçınılmazdır. Pratik koşullarda KKY hastalarının hangi grupta olduğunun belirlenmesine katkı verebilecek, tedavi izlenebilirliğini sağlayacak yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada doğal koşullarda MMVD ve DCM'ye bağlı olarak KKY gelişen ve ACVIM kalsifikasyonuna göre sınıflandırılan köpeklerde, serum inflamatuvar sitokin ve oksidatif stress biyobelirteçleri ile serum protein ifade farklılıklarının ortaya konması amaçlanmıştır, semptomatik KKY'li hastalarda belirtilen parametrelerde tedavi öncesi ve sonrası değişimlerin tespit edilmesi ile

de tedavi monitorizasyonunu kolaylaştırabilecek, hastalık patofizyolojisini detaylandırabilecek yeni biyobelirteçlerin belirlenmesine olanak sağlanmıştır.

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen projenin (OUAP(V)-2018/12) bir parçası olup, verilerin bir kısmı yayınlanmıştır (Rubio CP, Saril A, Kocaturk M, Tanaka R, Koch J, Ceron JJ, Yilmaz Z. Changes of inflammatory and oxidative stress biomarkers in dogs with different stages of heart failure. BMC Vet Res. 2020;16(1):433. DOI: 10.1186/s12917-020-02650-7).

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölüm; kalbin anatomi ve fizyolojisi ile birlikte kalp yetmezliğinin tanımı ve patofizyolojisini, bu sürece katkı veren inflamatuvar (sitokin) ve oksidatif stres yanıtlarını ve serum proteomik analizlerin detaylarını içerecek şekilde aktarılmıştır.

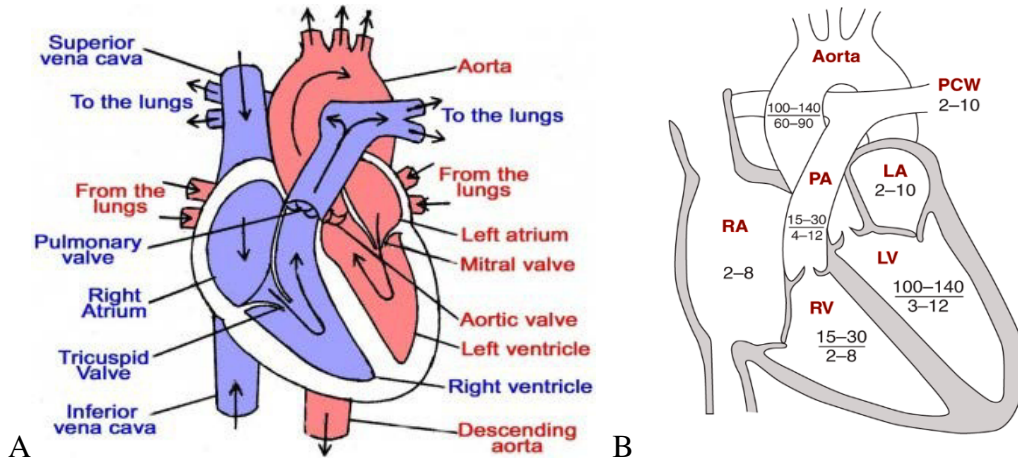
2.1.Kardiyak Anatomi ve Fizyoloji

Köpeklerde dört odacıktan oluşan kalp, perikard olarak bilinen lifli bir kese içindeki büyük damarlara bağlanmış şekilde toraksın merkezinde asılı şekilde bulunur. Perikardiyal kese adı verilen bu kesenin içinde kalbin kasılma ve gevşemesi sırasında sürtünmeyi azaltacak ve işlevini en iyi şekilde yapmasını sağlayan az miktarda perikardiyal sıvı bulunur. Bu kese aynı zamanda kalbin büyük damarlarını da çevreler ve üst kısma doğru uzanır (Iaizzo, 2015).

Venöz kan sistemik organlardan sağ atriyuma (RA) superior ve inferior vena kaval aracıyla geri döner, daha sonra triküspit kapaktan (TV) sağ ventriküle geçer (RV) ve oradan pulmoner kapak (PV) aracılığı ile pulmoner artere (PA) pompalanır (Şekil-1A). Pulmoner kılcal yatlardan geçerken oksijenlenen kan, pulmoner ven yoluyla sol atriyuma (LA) geri döner. Kan daha sonra mitral kapaktan (MV) sol ventriküle (LV), oradan da aort (Ao) aracılığı ile tüm vücuda pompalanır. Ventriküller kaslı duvarlarla çevrili kapalı odalarken kalp kapakları yapısal olarak sadece bir yönde akışa izin verecek şekilde tasarlanmıştır. Kalp kapakçıkları basınç gradyanının yönüne yanıt olarak pasif olarak açılır ve kapanır (Şekil-1B) (Iaizzo, 2015).

Ventriküllerin miyositleri, çevresel bir yönde düzenlenir; dolayısıyla, kasıldıklarında, ventriküler duvarlar içinde üretilen gerilim, bölme içindeki basıncın artmasına neden

olur. Ventriküler basınç PA ve Ao'daki basıncı aştığında, kan ventriküler kısımdan çıkış için zorlanır. Kalp döngüsünün bu aktif kasılma fazı sistol olarak bilinir. Üretilen basınçlar sistol sırasında ventriküllerde atriyumdan daha yüksektir; bu nedenle, TV ve MV kapanır. Ventriküler miyositler gevşediğinde, ventriküllerdeki basınç atriyumdaki basınçların altına düşer ve atriyoventriküler kapaklar açılır; ventriküller kanlanır ve bu faz diyastol olarak bilinir. Ao ve PA kapakları diyastol sırasında kapalıdır çünkü arteriyel basınçlar intraventriküler basınçlardan daha büyüktür (Iaizzo, 2015).



Şekil-1: Kalp ve kalp ile bağlantısı olan damarların anatomisi, kalp içinde kanın akış yönleri (A) ve kalp odacıkları arasındaki basınç farklılıkları (gradyan) (B) (Iaizzo, 2015).

2.2. Kalp Yetmezliği

2.2.1. Tanım: Kalp yetmezliği spesifik bir hastalık ya da tanı değildir. Kanın kalpten çıkış veya kalbe dönüş yeteneğindeki bozulma ile karakterize, fiziksel yetersizlikle sonuçlanan patofizyolojik bir sendromdur. Bu nedenle kalp yetmezliğine yol açan altta yatan primer (kalp ile ilgili) ve sekonder (kalp ile ilgili olmayan ama kalbi ve dolaşımı dolaylı olarak etkileyen) hastalıkların ortaya çıkartılması gerekmektedir. Kardiyak fonksiyonlardaki bozulma kompenzatuvar mekanizmaların devreye girmesine ve vücutta sodyum (Na) tutulumu ile birlikte su birikimine yani konjesyon ve ödem gelişimine yol açar; bu durum konjestif ya da kronik kalp yetmezliği (KKY) olarak tanımlanır. KKY

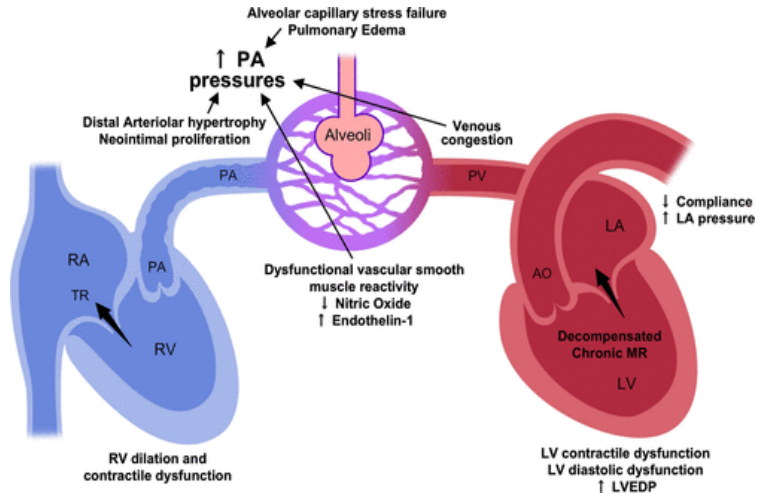
hastaların çoğunda sistemik (sağ KKY) veya pulmoner konjesyon (sol KKY) şekillenir (Kemp, & Conte, 2011).

2.2.2. Etiyoloji: KKY miyokardiyum, kalp kapakları ve perikardiyumdaki fonksiyonel bozulmaları içine alan birçok nedenden kaynaklanabilir (Tablo-1). İnsan ve köpeklerde KKY öncelikli olarak kronik kalp kapak hastalıkları (CVHD) ve DCM'den, kedilerde de hipertrofik kardiyomyopatiden (HCM) ileri gelmektedir (Vollmar, 2000; Riesen, Kovacevic, Lombard, & Amberger, 2007; Wess et al., 2010). CVHD'nin en yaygın formu olan MMVD küçük ırklarda, DCM ise daha çok büyük ırk köpeklerde ortaya çıkmaktadır (Parker, & Kilroy-Glynn, 2012; Stabej, Leegwater, Stokhof, Domanjko-Petric, & van Oost, 2005).

Tablo-1: Kronik kalp yetmezliğinin (KKY) öncelikli patofizyolojik mekanizmaları, bunları tetikleyen hastalıklar (etiyooloji) ve oluşturdukları kalp yetmezliği tipi (sol KKY; sol kalp yetmezliği ve Sağ KKY; sağ kalp yetmezliği) (Iaizzo, 2015).

Patofizyoloji	Etyoloji	CHF tipi
1- Myokardial yetmezlik	İdiyopatik DCM	Sol veya sağ KKY
	Myokardiyal işemi	Sol KKY
	İlaç toksisitesi (doksorubisin)	Sol KKY
	Enfektif myokarditis	Sol veya sağ KKY
2- Aşırı volüm yüklenmesi	Mitral kapak regürjitasyonu (dejeneratif vb.)	Sol KKY
	Aortik regürjitasyon (dejeneratif, enfektif vb.)	Sol KKY
	Konjenital defektler (VSD, PDA)	Sol KKY
	Trikuspid kapak regürjitasyonu (dejeneratif vb.)	Sağ KKY
	Trikuspid endokarditis	Sağ KKY
	Kronik anemi	Sol veya sağ KKY
3- Basıncı yüklenmesi	Tritoksikozis	Sol veya sağ KKY
	(sub)aortik stenozis	Sol KKY
	Sistemik hipertansiyon	Sol KKY (nadir)
	Pulmonik stenosis / hipertansiyon	Sağ KKY
4- Ventrikül dolmuş bozulması	Dirotifilariasis	Sağ KKY
	Hipertrofik kardiyomyopati (HCM)	Sol (± sağ) KKY
	Restriktif kardiyomyopati (RCM)	Sol (± sağ) KKY
	Kardiyak tamponad	Sağ KKY
	Konstriktif perikardiyal hastalık	Sağ KKY

2.2.3. Patofizyoloji: CVHD, DCM ve HCM gibi kalp hastalıklarının ortaya çıkışında insanlarda olduğu gibi genetik faktörler önemli rol oynamaktadır (Morita, Seidman, & Seidman 2005). DCM myokardiyal yetmezliğe bağlı olarak geliştiğinden önce sol kalp yetmezliği (sistolik yetmezlik) daha sonra da sağ kalp yetmezliğine yol açmaktadır. Kardiyak yangılar, enfeksiyonlar, infarktüslerin yanısıra uzun süren taşiaritmiler, bazı beslenme bozuklukları ve metabolik yetersizlikler miyokardiyal yetmezliklere neden olabilirler. Kalbin pompalama gücü bazı zamanlarda normal olabilirken, miyokardın kontraktilitesi yavaşça düşebilir. Bu durum genellikle CVHD’de gözlenmektedir (Jackson, Gibbs, Davies, & Lip, 2000). Mitral regürjitasyonla seyreden MMVD’de aşırı ventriküler volüm yüklenmesine bağlı olarak sol kalp yetmezliği meydana gelmekte, sol atriyal basınç ve pulmoner venlerde yükselen basınç pulmoner kapillar direncini yükselterek sekonder pulmoner hipertansiyon geliştirebilmektedir (Tablo-1 ve Şekil-2).



Şekil-2: Mitral regürjitasyona bağlı sekonder pulmoner hipertansiyon şekillenme mekanizması (Iaizzo, 2015).

Aşırı basınç yüklenmesi ventrikül tarafından kanın kalpten çıkışı sırasında normalden daha fazla basınç uygulanması sonucu oluşur ve en yaygın nedenleri

pulmonik ve subaortik stenozlar ile pulmoner ve sistemik hipertansiyondur. Aşırı sistolik basınç dolumu konsantrik hipertrofiyi tetiklemesinin yanında ventriküler duvar sertliğini artırır ve hastayı kardiyak işemeğe yatkın hale getirerek miyokardiyal kontraktileti azaltır. Perikardiyal hastalıkların yanısıra HCM de diyastolik fonksiyon bozukluğuna neden olur. Kontraktilete başlangıçta çoğu olguda normaldir ancak artmış ventrikül dolum basıncı konjesyona neden olur ve ventrikülün etkilenmesiyle kalpten çıkan kan miktarı azalabilir (Jackson et al., 2000).

Kalp yetmezliğinin oluşumu sistemik kompenzasyon mekanizmalarının yanısıra miyokard ve vaskular hücreler ile ekstraselüler matriksteki yapısal ve fonksiyonel değişimlerin olmasına neden olur. Kalbin boyutu ve şeklindeki bu sürekli değişim “cardiac remodeling” yani “yeniden şekillenme” olarak tanımlanır. Bu durumun gelişmesinde kapak hastalıkları, genetik mutasyonlar, akut yangılar, işemiler ve sistolik dolum basıncındaki artışlar rol oynamaktadır (Kemp, & Conte, 2011).

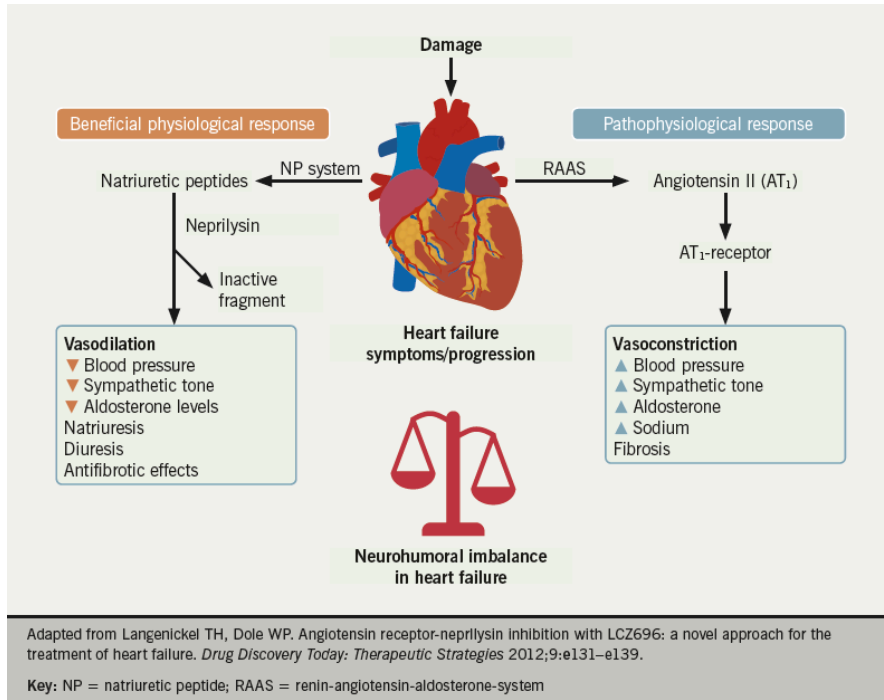
Miyokardiyal hipertrofi, kardiyak hücre kaybı (apoptozis), aşırı intersitisiyel matriks formasyonu ve miyositler arasındaki normal kollajen bağlayıcıların kaybı ventriküler yeniden şekillenme ile sonuçlanmaktadır. Duvar çaplarındaki artma; duvar stresini ve miyokardiyal oksijen ihtiyacını artırır. Yeniden şekillenmeyi uyaran etkenler arasında mekanik kuvvet, çeşitli nörohormonlar, TNF ve IL gibi proinflamatuvar sitokinler ve diğer faktörler de bulunmaktadır. Bunların yanısıra oksidatif fosforilasyon, enerji fosfat metabolizması, protein – protein etkileşimleri ve katekolamin metabolizmasındaki biyokimyasal anormallikler de farklı tip ve şiddetteki KKY modellerinde olası faktörler olarak tanımlanmıştır (Konstam, Kramer, Patel, Maron, & Udelson, 2011).

2.2.3.1. Nörohormonal Mekanizma

Kalp yetmezliklerindeki en büyük nörohormonal reaksiyon; sempatik sinir tonunda (SSS) artma, vagal tonusta azalma, renin anjiyotensin aldosteron sisteminde (RAAS) aktivasyon ve antidiüretik hormon salınımında artmadır. Nörohormonal sistem erken kompenzasyon mekanizması olarak Na ve su tutulumu ile vasküler hacmi ve vasküler tonu artırarak akut hipotansiyon ve hipovolemiyi gidermeye katkı sağlamaktadır (Şekil-

3). Kısa süreli dolaşım fonksiyonlarını normale getiren bu mekanizma (SSS ve RAAS), uzun süreli aktif kaldığında olumsuz gelişmelere yol açmaktadır (Tablo-2)

Aşırı su ve Na tutulumu ödem gelişimine neden olurken, sistemik damarlardaki daralma; kalbin çalışma yükünün (preload – ön yük) artmasına, kalpte ileri atım yetmezliğine ve kalp kapaklarında regürjitasyonlara yol açabilmektedir. Daha önemli bir nokta ise mekanizma hızının artmasının kardiyak fonksiyonu azaltması ve kalpte patolojik bir değişime yol açmasıdır. Vazodilatör ve natriüretik faktörlerin yanısıra artmış endotel ve proinflamatuvar sitokin üretimi de nörohormonal mekanizmanın sonuçları arasındaki kompleks etkileşime katkıda bulunur.



Şekil-3: Kronik kalp yetmezliği gelişiminde rol oynayan kompenzatuvar mekanizmalar (Philip, & Kalra, 2016)

2.2.3.2. Sentral Sinir Sistemi Etkisi: Farklı nörohormonal mekanizmaların aktive edilme derecesi, kalp yetmezliğinin şiddeti ve etiyolojisine göre değişmekle birlikte genellikle aktivite yoğunluğu arttıkça hastalığın prognozu kötüleşmektedir.

Nörohormonal mekanizma aktivasyonu başlangıçta seçici ve bölgesel iken generalize aktivasyon daha geç olmaktadır. Kardiyak ve renal sempatik aktivite ile natriüretik peptidlerin artan salınımı; başlangıçta asemptomatik sol ventrikül disfonksiyonu ile ve sonrasında da KKY ile sonuçlanmaktadır. Nörohormonal mekanizmanın ilk uyarının belirsiz olduğu bildirilirken, hipotansiyon uyarımının öncelikli olduğu düşünülmektedir. Artan sempatik (azalan parasempatik) ton; kalp hızını, kasılma ve rahatlama oranını arttırarak kalp debisinin artmasına ve vücut ihtiyaçlarının karşılanmasına olanak sağlamaktadır. Ancak bu sürecin uzun süre devam etmesi yani kronik sempatik uyarım (katekolamin - norepinefrin salınımı); miyokardiyal stres ve fibrosis, oksijen ihtiyacının artması, hücrel hasar ve kardiyak aritmi potansiyali gibi zararlı etkiler oluşturmaktadır (Tablo-2).

Tablo-2: Nörohumoral mekanizma ile aktive olan sistemler ve kompenzatuvar mekanizmaların kısa süreli olumlu ve uzun sürede ortaya çıkan olumsuz etkileri

Nörohumoral değişim	Olumlu etkiler	Olumsuz etkiler
Sempatik aktivite artışı	Kalp frekansı ve kontraktilite artar	Arterial vasokonstriksiyon
	Vasokonstriksiyon	Ard yük ve iş yükü artar
	Venöz dönüş artar	Oksijen tüketimi artar
	Dolum basıncı artar	
RAAS aktivasyonu	Su ve Na tutulumu	Vasokonstriksiyon
	Vaskular dirençte artma	Ard yük artışı
IL ve TNF artışı	Myosit hipertrofisi	Apoptosis
	Vasokonstriksiyon	
Endotelin artışı	Vasokonstriksiyon	Ard yük artışı
	Vaskular dirençte artma	

Katekolaminlere sürekli olarak maruz kalınması; miyokardiyal beta-1 reseptör yoğunluğunu azaltırken G-düzenleyici protein ile beta-2 reseptörlerin eşleşmesini de engellemektedir. Miyokardiyal beta-1 reseptörlerin katekolaminlerin kardiyotoksik ve

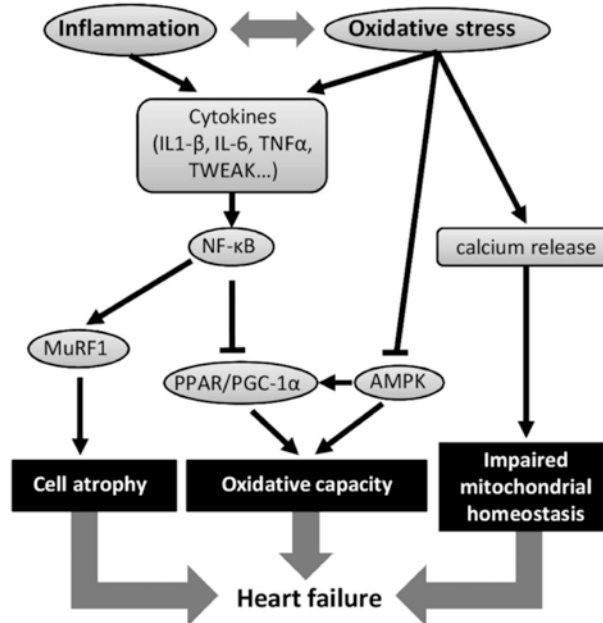
aritmogenik etkilerine karşı koruyucu etki yaptığı, ancak beta-2 ve alfa-1 reseptörlerin miyokardiyal hasar ve aritmogenezise katkıda bulunduğu, kardiyak beta-3 reseptörlerin de negatif inotropik etkiyle miyokardiyal fonksiyonu azalttığı bilinmektedir (Ware, 2011; Kemp, & Conte, 2011).

2.2.3.3. RAAS etkisi: Renal beta-1 adrenerjik stimülasyon ile perfüzyon basıncı ve renal tubülde Na azalması renal juxtaglomerular aygıttan renin salınımına yol açmaktadır. Renin; anjiyotensin (AT) prekürsörünü karaciğerde AT-I'e dönüştürürken, akciğerlerde bulunan AT dönüştürücü enzim (ACE) de inaktif AT-I peptidini aktif AT-II enzimine dönüştürmektedir (Şekil-3) (Ware, 2011; Kemp, & Conte, 2011). Güçlü bir vazokonstriktör olan AT-II; proksimal tubüllere direk etkiyerek ve adrenal korteksten aldosteron salınımını uyararak su ve Na tutulumuna neden olmaktadır. AT-II aynı zamanda iştah artışı, antidiüretikhormon (ADH) salınımı ve adrenal epinefrin sekresyonuna yol açmaktadır. Aldosteron hipokalemi ve hipomagnezemi artırırken kardiyak inflamasyon ve fibrozis ile ventriküler fonksiyonlara zarar vermektedir (Ware, 2011; Packer, 1992; Kemp, & Conte, 2011). Kalpte sentezlenen natriüretik peptitler kan hacmini ve basıncını düzenlemede önemli bir fizyolojik rol oynamaktadırlar. Natriüretik peptitler diürezis, natriürezis ve periferik vazodilasyonu desteklerken RAAS'ın etkilerini de antagonize etmektedirler (Ware, 2011). KKY'de baroreseptör yanıtının azalması; sürekli sempatik ve hormonal aktivasyon varlığına ve inhibe edici vagal etkilerin azalmasına yol açmaktadır. Baroreseptör disfonksiyonu miyokardiyal kontraktilitenin artması, kardiyak yükün azaltılması ve AT-II inhibisyonu ile ortadan kaldırılabilir ve böylece kalp yetmezliğinde iyileşme sağlanabilmektedir (Packer, 1992).

Endotelin-1 (ET-1) vasokonstriktör bir peptit olarak normal işlevi; endotelial kaynaklı vazodilatatörlere (nitrik oksit - NO ve prostasiklin) karşı vasküler tonu korumaktır. ET üretiminde hipoksi ve vasküler mekanik faktörler gibi uyarıcıların yanısıra bazı hormon (AT-II, ADH, epinefrin ve bradikinin) ve sitokinler (TNF ve IL-1) de rol oynamaktadır. Kronik olarak ET-1 artışı; vasküler düz kas ve miyokardiyal hipertrofiyi artırmak suretiyle kardiyak yeniden yapılanmaya katkıda bulunmaktadır (Ware, 2011; Packer, 1992).

2.2.3.4. Sitokin Etkisi

Sitokinler otokrin ve parakrin mediyatörler olarak işlev gören endojen peptitler olup kardiyovasküler yapı ve fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Sitokinlerin KKY'de artması, aşırı ve kronik yükselmelerinin kalp yetmezliğinin ilerlemesine katkıda bulunması; KKY ve inflamasyon arasındaki bağlantıyı güçlendirmektedir (Şekil-4). Başlatıcı unsur bilinmemekle birlikte sempatik aktivite, AT-II ve aldosterondaki kronik artışlar daha fazla sitokin üretimini uyarmaktadır. TNF ayrıca negatif inotropik etkilere sahip olan ve yeniden biçimlenme, hipertrofi ve apoptozise katkıda bulunan bir proinflamatuvar sitokindir ve strese yanıt olarak kalp, makrofajlar ve diğer dokular tarafından üretilmektedir. Bu durum başlangıçta iskemi ve hemodinamik aşırı yük için adaptasyon sağlayıcı ve koruyucu bir yanıt olsa da zamanla olumsuz etkiler ortaya çıkarmaktadır (Tablo-1). Pro-inflamatuvar sitokinler yüksek miktarda NO sentetaz (NOS) ekspresyonu ile miyokard üzerinde negatif inotropik ve sitotoksik etkiler oluşturabilmektedir (Kemp, & Conte, 2011; Packer, 1992).



Şekil-4: Kalp yetmezliği gelişiminde sitokin (inflamatuvar yanıt) ve oksitadif stresin etkileri (Belloum, Bekono, & Favier 2017)

Doku hasarı ve sepsis durumlarında makrofajlar gibi hücrelerden patern tanıma reseptörleri (PRR) aracılığı ile hasara bağlı (DAMP) ve patojene bağlı moleküler yapılar (PAMP) dolaşıma yayılmaktadır (Scaffidi, Misteli, & Bianchi, 2002; Tizard, 2013). Bu hücreler aynı zamanda doğuştan gelen bağışıklık sisteminin inflamatuvar yanıtının da anahtar bileşenleridir. Toll-like reseptörler en önemli PRR'dir ve bu sentinel hücrelerdeki interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör - alfa (TNF- α) gibi üç ana pro-inflamatuvar sitokin için genleri aktive etmektedirler (Scaffidi et al., 2002). Pro-inflamatuvar sitokinlerin sentinel hücrelerden salınması, bölgesel doku inflamasyonu ile birlikte sistemik inflamatuvar yanıtların da gelişimine yol açmaktadır (Herzum, & Renz, 2008). Makrofajlardan pro-inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi ve salınımı nötrofiller ile birlikte pıhtılaşma sistemi ve organ yetmezliğine yol açan diğer aracı reaksiyonları da aktive etmektedirler (Oda et al., 2005). IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ayrıca hepatik akut faz yanıtını aktive ederek önce yararlı etkiler ortaya çıkarmakta, uzun süreli aktivasyonlar sonrasında da çoklu organ fonksiyon bozukluğuna (MODS) zemin oluşturmaktadırlar (Baumann, & Gauldie, 1994; Steel, & Whitehead, 1994).

Sitokinler akut faz cevabında hücreler arası iletişimde ve sistemik (endokrin) reaksiyonların regülasyonunda önemli rol oynayan ve birçok hücre tipini etkileyen protein mediyatörleridir (Heinrich, Castell, & Andus, 1990; Le, & Vilcek, 1987; Day, & Schultz, 2014; Murtaugh, 1994; Kumar et al., 1996). Sitokin aracılı sinyaller geçicidir ve iletilen mesaj zaman içinde değişebilir. IL-1 β tipi sitokinler birincil uyarım ile ikincil sitokin sinyalini (IL-6 gibi) aktive ederken, IL-6 tipi sitokinler de IL-1 β tipi sitokinlerin üretiminde negatif feed back etkisi yaratmaktadırlar (Aderka, Le, & Vilcek 1989; Schindler et al., 1990).

Sitokin yanıtında değişken konak reaktivitesi septik hastaların prognozunun tanımlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Marty et al., 1994; Oberhoffer et al., 1999). TNF- α ve interlökinler (IL-1 β ve IL-6 gibi) gen polimorfizmi, prognoz ve yaşam süresine etki etmektedirler (Stuber, Petersen, Bokelmann, & Shade, 1996; Tomasdottir et al., 2003; Herzum, & Renz, 2008). Sitokinler (IL-1 β ve TNF- α) sepsiste miyokardiyal depresyona da neden olmaktadır (Finkel et al., 1992; Kumar et al., 1996; Bozza et al.,

1999; Parrillo et al., 1985; Schuette, Burch, Roach, & Parrillo, 1987; Gulick et al., 1989; Balligand et al., 1993). Sepsiste ortaya çıkan ve myokardiyumu deprese eden maddelerin (miyokardiyal depresan faktörler) 10 – 30 kD'lik moleküler kütleyle sahip olması ve bu nedenle de sitokinlerin moleküler yapılarına benzerlik göstermesi; septik inflamasyon ve sitokinlerin kalp yetmezliği patogenezindeki olası rollerini güçlendirmektedir (Parrillo et al., 1985; Reilly et al., 1989; Jha et al., 1993).

İnflamatuar sitokinler kalp hastalıklarında önemli bir rol oynamaktadır. Kaldı ki kalp yetmezliği ve inflamasyon arasındaki ilişki yirmi yılı aşkın bir süredir bilinmektedir (Levine, Kalman, Mayer, Fillit, & Packer, 1990). İnsanlarda kalp yetmezliğinin şiddeti ile paralel olarak serum CRP seviyelerinin de arttığı gözlenmiştir (Pye, Rae, & Cobbe 1990). CRP normal koşullarda serumda çok düşük seviyelerde bulunan, ancak inflamatuvar yanıtın başlangıcında karaciğerde üretilerek hızla ve önemli ölçüde dolaşımdaki düzeyi artan bir akut faz proteindir. Serum CRP'nin şiddetli kalp hastalıklı insanlardaki yükselişi mortalite artışıyla da doğru orantılı bulunmuştur (Alonso-Martinez et al., 2002). CRP'nin yanısıra kalp yetmezliği bulunan hastalarda, hastalığın şiddeti ile ilişkili olarak IL-6 ve TNF- α gibi dolaşımdaki pro-inflamatuar sitokin düzeylerinde de yükselmeler gözlenmiştir (Levine et al., 1990; Rauchhaus et al., 2000; Torre-Amione et al., 1996).

İnflamatuar yanıt mediyatörlerinin kalp yetmezliğinin şiddeti ile orantılı olarak artması; bu mediyatörlerin hastalığın tanısı ve şiddetinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir (Bozkurt, Mann, & Deswal 2010). Bu bağlamda asemptomatik hastalardaki serum IL-6 ve CRP seviyesindeki artışların kalp yetmezliği oluşumunu öngörmek için kullanılabilceği ileri sürülmüştür (Vasan et al., 2003). Kalp yetmezliklerinde inflamasyon gözlenmesine ve sitokin reaksiyonları aktive edilmesine rağmen bu yanıtların hastalarda primer ölüm nedeni olmayacağı; ancak, sistolik kalp yetmezliği ve hayatı tehdit eden kardiyak aritmilerin gelişiminde rol oynayarak ölüme zemin hazırlayabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle KKY sürecinde inflamatuvar yanıtların kontrol altına alınamadığında prognozun olumsuz şekilde etkileneceği de yadsınamaz bir gerçektir (Sharma, Coats, & Anker 2000).

Farelerde deneysel kalp hastalığı modelinde CRP'nin aşırı ekspresyonu sitokin seviyeleri ve fibrozisi artırırken kardiyak fonksiyonları da azaltmıştır (Nagai et al., 2011; Zhang et al., 2010). Ayrıca köpeklerde pro-inflamatuar sitokin TNF- α infüzyonunun sistolik ve diyastolik sol ventrikül fonksiyonunda önemli azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Pagani et al., 1992). Transjenik farelerde miyositlerde TNF- α üretiminin kardiyak fibrozisi ve disfonksiyonu indüklediği, ayrıca TNF- α 'nın apoptozu arttırdığı ve apoptotik miyositlerin kemoatraktanları serbest bırakarak makrofaj infiltrasyonunu arttırdığı bulunmuştur (Bryant et al., 1998).

İnsanlarda yapılan çalışmalar atriyal fibrilasyonun inflamasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Aviles et al., 2003). Atriyal fibrilasyonu olan hastaların dolaşımındaki CRP seviyesinin diğer hastalara oranla 2 kat fazla olduğu, ayrıca kalıcı atriyal fibrilasyonu olan hastaların, paroksizmal atriyal fibrilasyonu olan hastalara göre çok daha yüksek CRP düzeyine sahip oldukları belirlenmiştir. CRP seviyesinin atriyal fibrilasyonun ortaya çıkmasından sonraki 24 saat içinde en yüksek seviyelerine ulaştığı gözlemlenmiştir (Chung et al., 2001; Anderson et al., 2004). Atriyal fibrilasyonu olan hastaların atriyumda inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunda da artış olduğu kaydedilmiştir (Chen et al., 2008).

2.2.4 Oksidatif Stres

Son yıllarda, klinik ve deneysel çalışmalar, kalp yetmezliğinde reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) artmasıyla oksidatif stresin de arttığını göstermiştir. ROS'lar hücrel işlev bozukluğuna, protein ve lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına yol açarken, kardiyovasküler hastalıklarda geri dönüşümsüz hücre hasarı ve ölümüne de neden olabilmektedir. ROS'ların kalp yetmezliğinin gelişmesi ve ilerlemesinden sorumlu patofizyolojik mekanizmalarla ilgili olması oksidatif stresin önemini giderek arttırmaktadır (Tsutsui, Kinugawa, & Matsushima, 2011; Tsutsui et al., 2011). Kalp fonksiyonlarında merkezi rol oynayan proteinlerin ROS tarafından modifiye edilmesi; kasılma fonksiyonunu doğrudan bozabilmektedir. Bununla birlikte ROS'ların diğer olumsuz etkileri arasında; çeşitli hipertrofi sinyal kinazları ve transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesi, apoptozise aracılık edilmesi, kardiyak fibroblast

proliferasyonunun uyarılması ve matriks metaloproteinazların aktive edilerek hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesine yol açılması sayılmaktadır. ROS'lara bağlı gelişen bu hücrel olaylar miyokarda morfolojik ve fonksiyonel değişimlerin başlaması ve ilerlemesinde rol oynamaktadır (Tsutsui, Kinugawa, & Matsushima, 2011).

Endojen metabolik yollardan ROS'ların aşırı miktarda üretimi oksidatif strese ve kritik moleküllerin zarar görmesine neden olabilmektedir (Tsutsui et al., 2011). Vücut normal koşullarda endojen antioksidan üretmek yoluyla yeterli korumaya sahip olsa da pro-oksidan / antioksidan oranındaki bir dengesizlik; lipidlerin peroksidasyon riskini artırmakta, hatta DNA ve proteinlere zarar verebilmektedir (Freeman, Rush, Milbury, & Blumberg, 2005). Kardiyovasküler sistemde oksidatif stres doğrudan sitotoksositeye neden olabilmektedir. Endojen antioksidan sistemi karmaşıktır ve enzimatik antioksidanları (süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz), serbest radikal temizleyicileri (A, C ve E vitaminleri) ve metal şelatörleri içermektedir (Jacob, 1995).

Antioksidanların bazıları doğrudan ölçülebilmektedir. Bunun yansısı vücudun toplam antioksidan kapasitesi (TAC) ve oksijen radikal emme kapasitesi (ORAC) testleri ile genel bir ölçüm yapılmaktadır. İnsan kardiyovasküler hastalıklarında antioksidan araştırmaların birçoğu koroner arter hastalığında lipoproteinlerin oksidatif modifikasyonuna odaklanmış olmasına rağmen, iskemik olmayan sekonder KKY olan kişilerin ayrıca oksidatif strese maruz kaldıkları ve antioksidan tedavilere yanıt verdikleri belirtilmiştir. Domuz kalp yetmezliği modelinde miyokardiyal hipertrofinin kompanze edilmesi oksidatif stresin azalması ile ilişkilendirilirken, oksidatif stres artışının KKY gelişimi ve şiddetlenmesine yol açtığı gözlenmiştir. İdiyopatik DCM'li köpeklerde hastalığın şiddeti ile bağlantılı olarak oksidatif stres düzeyinde artma, E vitamini düzeyinde ise azalma saptanmıştır (Freeman et al., 2005). Rubio et al. (2016) yaptığı bir çalışmada TAC'ın belirlenmesi için birçok yöntem bulunduğunu ve bu yöntemlerin; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC), plazmanın ferrik indirgeme kabiliyeti (FRAP) ve kuprik indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) olduğunu belirtmişlerdir. Bu konuda yapılan birçok çalışmada geçmişte oksidatif stres

parametreleri olarak genellikle malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerinin değerlendirildiği görülmüştür (Todorova et al., 2004).

2.2.5. Kalp Yetmezliklerinin Sınıflandırılması

Kalp yetmezliği ile ilgili farklı sınıflandırmalar yapılmaktadır; fonksiyonlarına göre diyastolik ve sistolik kalp yetmezlikleri, kanın ilerleyiş yönüne göre ileri atım (forward failure) ve geri dönüş yetmezlikleri (backward failure), anatomik bölgelerine göre de sol ve sağ kalp yetmezlikleri (left / right sided heart failure) olarak tanımlanmaktadır. Bu sınıflandırmalarla birlikte hastaların klinik şikâyet durumlarına göre kalp yetmezlikleri kategorize edilmektedir. Bu amaçla Uluslararası Küçük Hayvan Kalp Sağlığı Konseyi (ISACHC) ve insanlardan adapte edilen şekliyle New York Kalp Birliği (NYHA) tarafından fonksiyonel sınıflandırmalar geliştirilmiştir (Tablo-3). Son yıllarda ise köpeklerde ACVIM tarafından tavsiye edilen kalp yetmezliği sınıflandırması yaygın olarak kullanılmaktadır (Atkins et al., 2009; Keene et al., 2019).

Bu fonksiyonel sınıflandırma sistemleri ayrıntılarına göre kısmen değişiklik gösterebilir de her biri hastanın klinik bulgularının şiddetine göre hastalığın ilerleyişini değerlendirmeye hizmet etmektedirler. Bu kategorizasyon tedavi protokollerin belirlenmesine yardımcı olurken klinik olarak asemptomatik ve semptomatik hastaların sınıflandırılmasına da temel oluşturmaktadır. NYHA fonksiyonel kalp yetmezliği sınıflandırmasında; Sınıf I asemptomatik hastaları, Sınıf II egzersiz ve yorucu aktiviteler sırasında klinik bulguların ortaya çıktığı semptomatik hastaları, Sınıf III günlük aktivitelerde ve hafif egzersizlerde klinik bulguların ortaya çıktığı hastaları belirtirken, Sınıf IV ise dinlenme durumunda bile klinik bulguların ortaya çıktığı kalp yetmezliğini tanımlamaktadır (Atkins et al., 2009). ISACHC ve NYHA gibi fonksiyonel sınıflandırma sistemlerinin değişen klinik bulgulara göre sıklıkla subjektif sonuçlar vermesi, kalp yetmezlikli hastaları daha nesnel olarak sınıflandırabilecek yeni bir sistemin gerekliliğini ortaya çıkartmıştır; ACVIM sınıflandırması (Atkins et al., 2009). Bu yeni sistemin öncelikli hedefi; hastalığın her aşamasını belirtilerin şiddetine göre uygun tedavilerle ilişkilendirmek olmuştur (Keene et al., 2019).

Tablo 3: Farklı kuruluşlara göre kalp yetmezliklerinin sınıflandırılması ve karşılaştırılması

ACVIM Atkins 2009	A Hastalıkla ilgili bulgusu olmayan riskli gruptaki hayvanlar	B₁ Üfürümü olan ancak radyolojik olarak kardiyak büyümesi olmayan asemptomatik hayvanlar B₂ üfürümü ve radyolojik olarak kalp büyümesi olan asemptomatik hayvanlar	C Kalp yetmezliği bulguları bulunan semptomatik hayvanlar	D Standart kalp yetmezliği tedavisine direnç gösteren hayvanlar	
NYHA Kvart, Haggström et al., 2002		I Üfürümü olan radyolojik olarak kalp büyümesi olmayan asemptomatik hayvanlar	II Radyolojik olarak kardiyak büyümesi olan ancak pulmoner ödem ve konjesyonu bulunmayan asemptomatik hayvanlar	III Hafif veya orta derecede semptomatik bulgular gösteren hayvanlar (dispnö, artmış kalp frekansı, intersitisiyel ödem)	IV Dinlenme durumunda bile ciddi semptomlar gösteren hayvanlar (Alveolar pulmoner ödem)
ISACHC ISACHC 1994		I a Kardiyak büyümesi olmayan asemptomatik hayvanlar I b Kardiyak büyümesi olan asemptomatik hayvanlar	II Hafif veya orta düzeyde klinik bulgu gösteren kardiyak büyümesi olan hayvanlar	III Şiddetli düzeyde kalp yetmezliği bulguları gösteren a Evde bakımı önerilen b Hospitalize edilmesi gereken hayvanlar	

ACVIM'e göre kalp yetmezliği dört temel aşamada değerlendirilmektedir. A ve B grupları asemptomatik, C ve D grupları ise semptomatik hastaları ifade etmektedir. A sınıfı; güncel olarak kardiyak problemi bulunmayan ancak yüksek risk altında olanları kapsamaktadır. B sınıfı; yapısal olarak kalp hastalığı bulunan ancak klinik belirtilerin henüz gelişmediği hasta grubunu tanımlamaktadır. Prognoz ve tedavi için farklı klinik uygulamalar nedeniyle B sınıfı hastaları B1 ve B2 olarak iki gruba ayrılmışlardır. B1 grubu; radyografik ve ekokardiyografik olarak kardiyak şekil değişimi gözlenmeyen ancak kardiyak üfürümü olan asemptomatik hastaları ifade ederken, B2 grubu kardiyak üfürüm ile birlikte radyografik ve ekokardiyografik olarak hastalığın tanımlanabildiği

ve/veya hemodinamik değişimlerin de gözleendiği hastaları tanımlamaktadır. C sınıfı hastalar yapısal kalp hastalığına bağlı olarak geğmiş veya güncel klinik kalp yetmezliği belirtileri olan hastaları göstermekte; tedavi sırasında hospitalize edilmesi gerekenler C1 sınıfı, gerektirmeyenler de C2 sınıfı hastalar olarak sınıflandırılmaktadır. Standart kalp yetmezliği tedavisine yanıt vermeyen (refraktör), klinik kalp yetmezliği bulguları olan son safhadaki kalp yetmezlikli hastalar D sınıfı, hospitalizasyon ihtiyacına göre de D1 ve D2 olarak tanımlanırlar (Atkins et al., 2009; Keene et al., 2019).

2.3. Kalp Yetmezliklerinin Tanısı

2.3.1. Anamnez ve signalament

Kardiyovasküler sistem muayenesinde ilk adım anamnez bilgisinin iyi bir şekilde alınabilmesi ve bu doğrultuda fiziksel muayenenin yapılabilmesidir. Anamnez hastanın doğmasal veya edinsel kalp hastalığı öyküsünün sorgulanması ile birlikte sistemik, metabolik, endokrin veya enfeksiyöz kökenli herhangi bir hastalık geğmişı bulunup bulunmadığının ve bakım – besleme koşullarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Kalp hastalığı ile ilgili olarak hasta sahipleri genellikle köpeklerinde; dispne, egzersiz intoleransı, senkop, öksürük, siyanoz, asitese bağlı abdominal genişleme, kilo kaybı gibi klinik şikayetlerden bahsetmektedirler (Fox, 1999).

Hastanın eşkal bilgileri kalp hastalıklarının tanımlanmasında yardımcı olabilecek faktörlerdendir. Genç köpeklerde yaşı hastalardaki edinilmiş kalp hastalıklarının aksine doğmasal kalp hastalıkları daha çok görülmektedir. Yaşı köpeklerde ise mitral ve trikuspidal regürjitasyonlar, kalp kökenli tümörler gibi edinilmiş kalp hastalıkları daha çok gözlenmektedir (Van Israël, French, Dukes-McEwan, & Welsh, 2003). Bazı ırkların (Doberman Pinschers, Cocker Spaniels, Great Danes, Irish Wolfhounds, Boxers, Poodles, Pekingese ve Boston Terriers vb.) bazı kalp hastalıklarına (DCM, MMVD, PA ve Ao stenozlar vb.) yatkınlığı belirtilmektedir (Petrič, 2015). Serfass et al. (2006) yapmış oldukları çalışmada mitral kapak hastalıklarına Cavalier King Charles Spaniel ırkı köpeklerin diğer ırklara göre daha yatkın olduğunu saptamışlardır. Bunun yanısıra Doberman Pincher, Golden Retriever, İngiliz Buldog, Great Dane ırkı köpeklerin

DCM'ye yatkın olduğu, hatta Great Dane ırkı köpeklerde X kromozomundaki resesif bir gen ile kuşaklar arasında aktarımının olduğu ortaya konulmuştur (Broschk, & Distl, 2005). Erkek köpeklerin dişi köpeklere oranla kalp yetmezliklerine daha yatkın olduğu rapor edilmiştir (Thrusfield, Aitken, & Darker 1985). Aşırı kilolu ve obez hastalarda DCM gibi kalp hastalıkları ile birlikte hipotiroidizm gibi metabolizma hastalıklarının da olabileceği unutulmamalıdır. Kaşektik hastalarda da kardiyak kaşeksi varlığının araştırılması gerektiği önerilmektedir. Hasta bir köpeğin hangi alanda kullanıldığının bilinmesi de çok önemlidir, çünkü av köpeklerinin buldukları ortam koşulları gereği kalp kurduna daha predispoze oldukları bilinmektedir (Fox, 1999).

2.3.2. Fiziksel muayene

Kardiyolojide büyük teknolojik ilerlemelere rağmen fiziksel muayene kalbin değerlendirilmesinde halen en önemli unsur olmaya devam etmektedir. Fiziksel muayenenin inspeksiyon ile başlaması; öncelikle hastanın genel durumu, solunum için uyguladığı çaba, solunum hızı ve karakterinin gözlenmesi önerilmektedir (Ware, 2011). Sol ve sağ kalp yetmezliklerine göre hastalarda farklı klinik bulgular gözlenebilmektedir (Tablo-4). Sol kalp yetmezliğinde sistolik yetersizlik ile ilgili olarak mukoz membranlarda solgunluk, periferal nabız kalitesinde azalma ve mitral regürjitasyonla seyreden olgularda pulmoner ödem gözlenirken, sağ kalp yetmezliğinde öncelikle siyanozis, vücut boşluklarında sıvı toplanması (asites ve hidrotoraks), dipnö ve jugular dolgunluk ön plana çıkmaktadır (Fox, 1999; Ware, 2011).

Toraks oskültasyonu akciğerler, kalp ve büyük damarlar hakkında bilgi sağlayan kardiyovasküler muayenenin en değerli parçasıdır. Torasik oskültasyonu sistematik bir şekilde yapılmalı, tüm toraks dikkatlice oskülte edilmelidir (Fox, 1999). Kalp sesleri değerlendirilirken solunum sesleri üfürüm seslerini taklit edebilir. Bu durumda hastanın ağzı ve burun delikleri kapatılarak kısa süreli olarak solunum seslerinin karışıklık yaratması engellenmelidir. Kalp oskültasyonu yapılırken mitral, aortik, pulmoner ve triküspidal kapak bölgeleri için anatomik noktalar belirlenmiştir; örneğin mitral kapak sol tarafta 5. interkostal aralıkta kostakondral eklem hizasından, triküspidal kapak ise

sağ tarafta 3.-5. interkostal aralıkta kostakondral ekleme yakın olan kısımdan rahatlıkla oskulte edilebilmektedir (Smith Jr ve diğerleri, 2016).

Tablo 4: Kalp yetmezliğinin yerleşim yerine göre klinik belirtileri ve olası nedenleri (Fox, 1999)

SOL KALP YETMEZLİĞİ		SAĞ KALP YETMEZLİĞİ	
Klinik Belirti	Nedeni	Klinik Belirti	Nedeni
Egzersiz İntoleransı	Kas Perfüzyonu-Azalma	Dispnö-Taşipnö	Pulmoner Ödem
Muk. Mem. Solgun Ekstremitte-Soğuk	Periferel Vasokonstriksiyon	Öksürük	Reseptör Stimulasyonu
Taşikardi	Sempatik Aktivasyon	Jugular Dolgunluk Hepatomegali	Pasif Konjesyon
PNK Zayıf	Kalp Debisi Düşümesi	Asites	Pasif Konjesyon
BUN-Cr Artma	GFR'de Düşüme	Hapşırma Tıksırma	Alveolar Ödem
Oliguri	GFR'de Düşüme	Siyanoz	Hipoksi
Susama	Angiotensin II Aktivasyonu	Kardiomegali	Sıvı Retensiyonu

Kalbin oskültasyonu sırasında normal kalp sesleri dışında üfürüm adı verilen sesler de duyulmaktadır. Kalp üfürümleri; normal, sessiz, laminer kan akımının kesintiye uğradığında oluşan türbülanslı kan akışından kaynaklanmaktadır. Üfürümlerin yoğunluğu 6 üzerinden puanlama sistemine göre belirlenmektedir. Buna göre; 1/6 üfürüm sadece özel bir çaba ile duyulurken, 2/6 üfürüm deneyimli bir araştırmacı tarafından duyulan, 3/6 üfürüm orta dereceli, 4/6 üfürüm ise yüksek sesli ve kolayca duyulabilen patolojik kalp sesleridir. Prekordiyal trıl (palpasyonda parmak uçlarında üfürüm nedeni titreme) oluşturan yüksek sesli üfürümler de 5/6 ve 6/6 olarak derecelendirilmektedirler. Üfürümler sistolik, diyastolik ve sürekli üfürüm olarak sınıflandırılırken, üfürümün çeşidi hastalıklar arasında ayırıcı tanı yapılmasına katkı sağlamaktadır; örneğin sistolik üfürümler mitral ve triküspidal yetmezliklerde tespit edilmektedir (Fox, 1999; Ware, 2011).

2.3.3. Toraks görüntüleme

Pratikte tanıya giden en önemli adımlardan bir tanesi de radyografidir. Kaliteli torasik radyografiler kalp hastalığı olan köpeklerde genel kardiyak boyut ve şekil hakkında önemli bilgiler sağlarken pulmoner kan damarları, akciğerler, plevra, mediasten ve diyafram hakkında da detaylar vermektedir. Hastaların laterolateral (LL) grafi ile birlikte dorsoventral (DV) veya ventrodorsal (VD) grafi olmak üzere çift pozisyonda değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir. Kalp hastalıklarının değerlendirilebilmesi için sağ lateral yatış pozisyonu en uygun çekim pozisyonu olarak kabul edilmektedir (Fox, 1999).

İrk farklılığına bağlı olarak; köpeklerde farklı göğüs yapılarından dolayı kalbin radyografik görünümünde de farklılıklar olmaktadır. Yuvarlak göğüs yapısı olan köpeklerde, kalbin LL pozisyonda sternal temasının arttığı ve DV/VD pozisyonda oval bir görüntüde olduğu; dar ve derin göğüs yapısındaki köpeklerde ise LL pozisyonda daha dik ve uzun bir görünümde, DV/VD pozisyonda da normalden daha küçük veya oval bir yapıda olduğu gözlenebilmektedir (Ware, 2011). Göğüs yapısından bağımsız olarak vücut ağırlığı ve kalp boyutu arasında pozitif korelasyon söz konusudur. Bu korelasyon temelinde köpeklerdeki kardiyomegali varlığını ve derecesini ortaya çıkarmak için LL grafi üzerinden hesaplanabilen vertebral kalp skoru (VHS) geliştirilmiştir (Buchanan, & Bücheler, 1995). VHS'nin 8-10,5 arasında olması çoğu ırk için normal kabul edilirken bazı ırklarda (örneğin Minyatür Schnauzer) varyasyonlar olabilmektedir (Fox, 1999; Ware, 2011).

Kardiyak büyüme (kardiyomegali); kalp boyutunun toraks ile karşılaştırılması ve toraks içindeki yapıların kalpteki boyut değişimine göre aldığı pozisyonlar temelinde belirlenmektedir. Kardiyomegali olgularında; kalp LL ve DV/VD pozisyonda normalden daha geniş (>3-3.5 interkostal alan) görünür ve genellikle yuvarlaklaşma eğilimindedir. Trakea dorsale doğru yer değiştirir ve kaudal vena kavanın diyaframdan kalbe doğru eğimi dikkat çekici olmaktadır. DV/VD pozisyondaki grafielerde generalize kardiyomegali ile birlikte kardiyotorasik oranın arttığı gözlemlenir. Kalbin maksimum

enine genişliğinin toraksın maksimum enine genişliğine oranı köpeklerde normalde 0.6 iken, bu oran kardiyomegalik olgularda daha büyüktür (Fox, 1999; Ware, 2011).

Sol kalp büyümelerinde; trakea ile kalbin sol atriyumunun kaudal sınırı arasındaki açı, sol atriyal genişleme nedeniyle değişim göstermektedir. Kaudal trakea ile birlikte sol ana bronş veya her iki bronş birlikte dorsale doğru yer değiştirmektedir. Sol atriyuma bağlı mekanik bronşiyal sıkışma (bronkokonstriksiyon) KKY'nin bulunmadığı durumlarda öksürme nedeni olarak dikkate alınmaktadır. DV/VD görüntülerinde de sol atriyal dilatasyon göstergesi olarak; sol aurikülün sol ventrikül sınırının ötesinde saat 2 - 3 yönünde bombeleşme yaptığı gözlenmektedir. KKY gelişmeden önce sol atriyumda genellikle değişen şiddette büyüme tespit edilmektedir. Sağ kalp büyümelerinde ise LL görünümde kardiyak silüetin sağ atriyal uzantının genişlemesi nedeniyle kraniale doğru büyüdüğü ve trakeanın kalbin kranial kısmından geçtiği noktadan dorsale doğru deviyeye olduğu gözlenmektedir. DV/VD görüntülerinde sağ atriyal dilatasyon kalp silüetinde saat 9 - 11 yönünde bombeleşme ile kendini belli etmektedir (Fox, 1999).

Toraks radyografisinde kalp, damarlar (aort, vena kava ve pulmoner arter ve venler) ve trakea dışında değerlendirilen bir diğer yapı; akciğerlerdir. KKY sürecinde olguların şiddeti ile doğru orantılı olarak akciğerlerde lokal ya da generalize alveolar veya interstisyel desenler gözlenebilmektedir. Hafif olgularda sol atriyal dilatasyon ve kaudal diaframatik akciğer loblarında ödem tespit edilirken, şiddetli KKY geliştiğinde generalize pulmoner ödem (beyaz akciğer) görünümü hakim olmaktadır. Akciğer ödemi tespitinde torasik ultrasondan da yararlanılmaktadır. Görüntü ekranında yukarıdan aşağıya doğru beyaz bir gölge şeklinde tespit edilen ve "B line" olarak tanımlanan dalgalar ödemi ve şiddetini göstermektedir (Ware, 2011).

2.3.4. Elektrokardiyografi (EKG)

EKG; pozitif ve negatif elektrotlar vasıtasıyla kalpte değişen elektriksel aktivitenin değerlendirilmesine olanak sağlayan ve ritim analizi için ideal kabul edilen tanısal bir yaklaşımdır (Ware, 2011). EKG kalbin morfolojik değişimlerinin belirlenmesinde sensitif bir metot olarak önerilmemektedir (Martin, 2015). P dalga voltajının yükselmesi

(P-pulmonale) sağ atriyal büyüme, süresinin uzaması da (P-mitrale) sol atriyal büyüme düşündürse de bu patolojik değişimlerin mutlaka ekokardiyografik ölçümlerle doğrulanması gerekmektedir. QRS kompleksinin voltajı normale göre (maksimum 3-3.5 mV/DII) artması; sol ventriküler büyüme düşündürürken, azalması hidrotoraks ve/veya perikardiyal efüzyonu akla getirmektedir. Bazı ırklarda derin göğüs yapısına göre fizyolojik olarak QRS kompleksi düşük voltajlı çıkabilmekte, bazı olgularda da hipotroidizm gibi senkonder endokrin problemlerin yansması olabilmektedir (Ware, 2011). Derin Q ve S dalgaları; interventrikular septumdaki ileti uzamasını gösterirken ventriküler morfolojik ve ya patolojik değişimlerin belirteci olarak düşünülmektedir. Derin S dalgaları daha çok sağ ventriküler büyümenin EKG bulgusu olarak yorumlanmaktadır. ST elevasyonu ya da depresyonu da kardiyak ya da non-kardiyak hipoksik olayların varlığı ve takibine imkan sağlamaktadır (Fox, 1999; Martin, 2015).

EKG de morfolojik değişimlerin mutlaka görsel tanı teknikleri ile doğrulanması gerekmektedir. Ritim analizlerinde özellikle kalp yetmezliklerine eşlik eden problemler içinde; atriyal fibrilasyonu kapsayan supraventriküler taşikardiler, atrial veya ventriküler prematüre vurumlar ve ileri durumlarda değişen derecelerde kalp blokları saptanabilmektedir. EKG uygulaması tanısav avantajlar yanında hekime tedavi aşamasında ilaç seçimlerinde ve anti-aritmik ajanların gerekliliği konusunda önemli katkılar sağlamaktadır (Ware, 2011).

2.3.5 Kardiyak biyobelirteçler

Kalp yetmezliği yalnızca kalpte aşırı yüklenme veya yaralanmadan değil aynı zamanda kardiyak miyositler, kardiyak interstisyum veya her ikisi üzerinde etkili olan genetik, nörohormonal, inflamatuvar ve biyokimyasal değişiklikler arasındaki karmaşık etkileşimler sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle kardiyak stres ve işlev bozukluğunu yansıtabilen biyobelirteçlerin klinik önemi gittikçe artmaktadır (Braunwald, 2008).

Biyobelirteçler altta yatan mekanizmalara ışık tutarken karmaşık hastalık durumlarının daha iyi anlaşılmasına da olanak sağlamaktadırlar. Geçmişten bugüne teknolojik gelişmelere paralel olarak insan ve hayvanlarda birçok kardiyak biyobelirteç kullanılmıştır. Bunlar arasında bazı enzimler (AST, ALT, LDH, CK-MB, vb.),

hormonlar (katekolaminler, natriüretik peptidler), iz minareller (Cu, Zn ve Mg) ve proteinler (myoglobin, endotelin-1 vb.) olsa da güncel olarak kardiyak troponinler ve natriüretik peptidler yaygın olarak tercih edilmektedir (Rajappa, & Sharma, 2005; Hochholzer, Morrow, & Giugliano 2010). Adrenomedullin, ST2 ve nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalin gibi parametrelerin kardiyak biyobelirteç olabirlikleri üzerine araştırmalar da devam etmektedir (Rehman, Mueller, & Januzzi, 2008; Bolignano et al., 2009; Yanavitski, & Givertz, 2011). Köpek ve kedilerde ise kardiyak troponin (cTn) içinde bulunduğumuz dönemde hastalığın teşhisine olanak sağlayan en önemli biyobelirteç olarak öne çıkmaktadır (Sleeper, Clifford, & Laster 2001).

Troponinler sadece çizgili kaslarda bulunan kas proteinleridir. Bu nedenle iskelet kasları ve kalp kası (myokardiyum) ile sınırlı olup düz kaslarda bulunmamaktadır. İskelet ve kalp kasındaki çizgili desen miyofibriller içindeki filamentlerin (kalın ve ince) düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır (Wells, & Sleeper, 2008). Kalın filamentler neredeyse tamamen büzülme proteini olan “miyozin” den oluşurken, ince filamentler ise kontraktıl protein “aktin” ile birlikte tropomiyosin ve troponin adı verilen diğer iki düzenleyici proteini içermektedir (Fox, 2006). Troponinler; ince filament boyunca düzenli aralıklarla uzanan hetero-trimerik bir komplekstir ve bu kompleks farklı 3 proteinden oluşmaktadır: troponin C (cTnC), troponin T (cTnT) ve troponin I (cTnI) (Solaro et al., 2008). Troponin kompleksini oluşturan bu proteinler farklı fonksiyon, yapı ve moleküler ağırlığa sahiptirler. Bunlardan cTnI; troponin kompleksinin inhibitör alt birimi ve çubuk benzeri esnek bir proteini olup molekül ağırlığı da 22 kDa'dır (Collinson, Boa, & Gaze 2001).

Genel olarak cTnI; cTnT ve cTnC'ye göre myokardiyal hasarı göstermede daha spesifik olduğu bilindiğinden hem pratikte hem de bilimsel çalışmalarda diğerlerine göre daha çok tercih edilmektedir. Bununla birlikte cTnI'nın daha az şiddetli hastalıklarda da serum düzeylerinin artması, cTnI'nın miyokardiyal hasar için daha duyarlı olduğunu desteklemektedir. Kaldı ki cTnI hem myokardiyal hasarın boyutuna göre serum düzeyi değişim göstermekte hem de diğer kardiyak biyobelirteçlerden daha önce ve dramatik bir yükselim sergilemektedir (Langhorn et al., 2013).

Tüm natriüretik peptitler önprohormonlar olarak üretilmekte daha sonra parçalanarak biyolojik olarak aktif peptitler haline dönüşmektedirler (D'Souza, Davis, & Baxter 2004). Biyobelirteç olarak bilinen ve sık olarak kullanılan natriüretik peptidler; atrial (ANP) ve beyin natriüretik peptidler (BNP)'dir (Sergeeva, & Cristoffels, 2013). C-tipi natriüretik peptid (CNP) ise damar duvarları ile birlikte makrofajlar, nöronlar, osteoblastlarca da sentezlendiğinden kardiyak biyobelirteç potansiyeli zayıf olarak değerlendirilmektedir (D'Souza, Davis, & Baxter 2004).

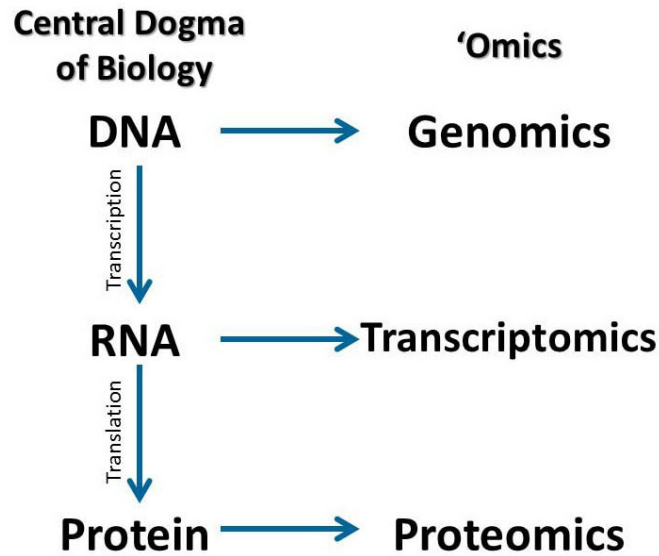
ANP'nin başlıca sentez yeri kalp atriumu olmakla birlikte LV disfonksiyon ya da ventriküler hipertrofi durumlarında ventrikül dokusundan da köken alabilmektedir. Salgılanan peptidler atrium kas hücreleri içerisindeki granüllerde depolanmaktadır. ANP kalp dışında; hipotalamus, hipofiz, adrenal medulla, gastrointestinal sistem, timus, korpus luteum, ovaryum ve testis gibi organlarda da sentezlenebilmektedir. ANP üretildiği anda 126 aminoasit içeren bir pro-hormon olarak bulunurken, kana 28 aminoasitli olarak verilir. Bu durum atriyopeptidaz isimli enzimin 126 aminoasitli öncül ANP'yi 98 ve 28 aminoasitli iki parçaya ayırmasıyla sağlanmaktadır (D'Souza et al., 2004).

BNP'nin ana kaynağı hemodinamik stres yaşayan ventriküler kardiyak miyositlerdir. BNP 32 amino asitten oluşan bir nörohormondur (Ware, 2011). BNP ventriküllerde ve öncelikle sol ventrikülde sentez edilmekte, depolanmakta ve salgılanmaktadır. ProBNP proteoliz ile aktif BNP'ye ve 76 amino asit içeren inaktif N-terminal proBNP'ye (NT-proBNP) ayrışmaktadır. BNP ve NT-proBNP ventriküllerin geriliminde artış ve çeşitli nörohormonal faktörlerin uyarısıyla miyositlerden ve miyokardiyal bölgedeki fibroblastlardan üretilerek koroner sinüsler aracılığıyla pulsatif olarak dolaşıma salınmaktadır (D'Souza et al., 2004). BNP'nin yarı ömrü kısa (yaklaşık 20 dakika), NT-proBNP'nin yarı ömrü ise daha uzundur (yaklaşık 90 dakika). BNP etkisini vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kalp, adrenal bez ve böbrekte bulunan natriüretik peptid reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. BNP'nin öncelikli görevleri: natriürezisi uyarmak, glomerüler filtrasyon hızını arttırmak ve periferik arter dilatasyonu ile

kardiyak dolum basınçlarını azaltmak ve RAAS'ın etkilerini antagonize etmektir (Del Ry, Cabiati, & Clerico 2013).

2.4. Proteomik

“Proteom” terimi ilk kez 1995 yılında bir genomun protein komplemanını belirsiz olarak tanımlamak için kullanılmıştır (Blackstock, & Weir, 1999). Proteomik; bir hücrenin veya bir organizmanın protein ekspresyon analizi ile ilgilenen ve hızla gelişen bir moleküler biyoloji alanıdır (Şekil 5) (Fields, 2001). Proteomik sadece proteinlerin tanımlanması ve nicelendirilmesi değil aynı zamanda lokalizasyonları, modifikasyonları, etkileşimleri, aktiviteleri ve sonuç olarak fonksiyonlarının belirlenmesini de içermektedir. İlk yıllarda protein ayrılması ve tanımlanması için sadece iki boyutlu jel elektroforezini kapsayan proteomik çalışmaları, şimdi gelişen teknoloji ile birlikte büyük protein setlerini karakterize edebilecek düzeylere gelmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalara paralel olarak olağanüstü miktarda veriyi işlemek, analiz etmek ve yorumlamak için yenilikçi hesaplama araçları ve yöntemleri de (biyo-informatik) geliştirilmiştir (Fields, 2001; Mehta et al., 2008).



Şekil 5: Genomik, transkriptomik ve proteomik arasındaki bağlantı (yanggen564s18.weebly.com/transcriptomics.html)

Bazı değişkenlere göre farklılık gösteren numuneler arasındaki protein ekspresyonunun nicel çalışması ekspresyon proteomik olarak adlandırılmaktadır. Bu yaklaşım ile numuneler (hasta ve sağlıklı) arasındaki tüm protein ekspresyon farklılıkları karşılaştırılır ve böylece hastalığa özel proteinlerin tanımlanmasına olanak sağlanmaktadır. Örneğin; bir kanser hastasından alınan tümör numuneleri, normal bir kişinin aynı doku numunesi ile diferansiyel protein ekspresyonu için analiz edilebilmekte; tümör tanı ve progresyonunda rol oynayan protein detayları ortaya çıkarılabilmektedir. Proteomik analizlerde doku örneklerinin yanısıra serum, plazma, idrar ve sinovyal sıvılar gibi vücut sıvıları da kullanılabilmektedir (Sensen, 2001). Klinisyen çalışmalarında daha çok ekspresyon proteomiğinin tercih edilmektedir. Böylece; herhangi bir hastalığa sahip bireylerden elde edilen örnekler (serum vb.), sağlıklı bireylerin aynı tarz örnekleriyle karşılaştırılarak hastalık ve sağlık durumunun ayrılmasına olanak sağlayan proteinlerin ortaya çıkartılmasına olanak sağlanmaktadır (Kocatürk ve diğerleri, 2016).

Ekspresyon proteomik'de normal ve hasta bireylerde aynı hücre veya dokuyu karşılaştırmanın aksine yapısal proteomik'de; belirli bir hücrenel organelde bulunan protein komplekslerinin yapı ve doğası ortaya çıkarılmaktadır. Bu yaklaşımın amacı; bir kompleksin içinde bulunan tüm proteinlerin tanımlanması ve bu proteinler arasında meydana gelen tüm protein - protein etkileşimlerinin karakterize edilmesidir. Spesifik alt hücrenel organellerin veya protein komplekslerinin saflaştırma yoluyla izole edilmesi; hücrelerin mimarisi hakkında bilgi toplanmasına imkân sağlarken bazı proteinlerin bir hücreye benzersiz özellikleri nasıl kazandırdığını da gösterilmektedir (Sensen, 2001).

İşlevsel proteomik bir canlı hücrede bulunan moleküler ağların özelliklerini analiz etmek için proteomik yöntemlerin kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Bu yaklaşımın ana hedefi; bu ağlara katılan moleküllerin belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Fonksiyonel proteomik ile önemli moleküllerin bir hücrenin sitoplazmasından çekirdeğe ve bunun tersine geçmesi için önemli olan yeni proteinlerin tanımlanması mümkün olmuştur (Sensen, 2001).

Proteomik; proteinlerin yapısı, işlevi, modifikasyonu, miktar tayini ve yeri ile bunlar arasındaki etkileşimlerin bilgisini içermektedir (Carrera, Gallardo, Pascual, Gonzalez, & Medina, 2016). Protein ayırma ve tanımlama için çeşitli tekniklerin geliştirilmesi ile birlikte serum proteomunun karakterizasyonu ve tanımlanması mümkün hale gelmiştir. Bu teknikler; sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), iki boyutlu elektroforez (2-DE), denatüre edici olmayan PAGE, izoelektrik odaklama (IEF) gibi jel bazlı proteomik teknikleri ve sıvı kromatografisi (LC) gibi jel içermeyen proteomik teknikleridir (Carrera, Gallardo, Pascual, Gonzalez, & Medina, 2016)). Serum proteomik çalışmalarında günümüze kadar kütle spektrometresine bağlanmış sıvı kromatografisi (LC-MS) veya tandem kütle spektrometrisi (LC-MS / MS), matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş kütle spektrometrisi (MALDI-TOF / MS) ve yüzey geliştirilmiş lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (SELDI-TOF / MS) gibi teknikler kullanılmıştır (Amado, Ferreira, & Vitorino 2013; Shrader, 2014).

2.5. Kalp Yetmezliği Tedavisi

KKY'de tedavi hedefleri hastalığın evresine; kısa dönem, akut dekompanse hastalar için uzun dönem veya stabil pozisyondaki bir hastaya göre farklılıklar göstermektedir. Kısa vadede hemodinamik fonksiyonun (atriyal basınçların düşürülmesi ve kardiyak debinin iyileştirilmesi, vb.) optimize edilmesi hayati öneme sahip olsa da uzun vadede nörohormonal aktivasyonun modülasyonu düşünülmelidir. Uygun tedavi yaklaşımlarına rağmen ventriküler yeniden şekillenmenin tersine çevrilme ve ani ölümlerin önlenme beklentisi bazen karşılanamayabilir (Fuentes, 2009). Son yıllarda tanıda öncelikli olarak kullanılan ACVIM klasifikasyonu, tedavi seçeneklerini belirlemek için de veteriner hekimlere klavuzluk etmektedir (Tablo 5). ACVIM'e göre A ve B sınıfları asemptomatik, C ve D sınıfı hastalar da semptomatik hastaları temsil etmektedir (Keene ve diğerleri., 2019).

A sınıfı: Bu sisteme göre A sınıfı olarak tanımlanan köpekler; kalp hastalıkları için predispoze ırkları içermekle birlikte asemptomatik durumda olduklarından herhangi bir ilaç desteğine ya da koruyucu uygulamalara (ilaç, besin takviyeleri ya da diyeter düzenlemeye) ihtiyaç göstermemektedirler. Bu grup köpeklerin mitral regürjitasyon bulgusu varsa; yetiştirmeden çıkartılması ve genetik aktarım zincirinin kırılması önerilmektedir (Keene et al., 2019).

B sınıfı: Bu grup hastalar asemptomatik fazda kalp hastalığı bulunan köpekleri kapsamakta, üfürüm ve kardiyomegali varlığına göre de B1 ve B2 olarak alt gruplara ayrılmaktadırlar. B1 grubu hastalara herhangi bir medikal ve diyeter uygulama önerilmezken, B2 grubu hastalarda ilaç ve takviye ürün kullanılması konusunda tam bir uzlaşma sağlanamamıştır. B2 hastalarında kalp hastalığının ilerlemesini en aza indirmek adına tedaviye başlamanın çok değerli olacağını öneren çalışmalar söz konusudur. ACE inhibitörleri ve/veya furosemide uygulaması ya da yalnız beta blokör ilaç uygulaması bu grup hastalar için önerilmiş, ancak beklentilerin çok da karşılanamadığı görülmüştür. Hatta ACE-i ilaçlar RAAS'ı bloke ederek kardiyak adaptasyon mekanizmalarından birinin devre dışı bırakırken, beta-blokörler de sempatik sistem inhibisyonu ile kalp frekansını düşürmekte (negatif kronotropik etki) böylece yan etkilerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedirler (Fuentes, 2009). Diğer taraftan Ouellet et al. (2009) yaptığı çalışmada B2 hastalarında ACE-i kullanımına ek olarak pimobendan kullanılmasının mitral kapak yetersizliklerinde uzun vadede önemli katkılar sağladığını belirtmişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise; yalnız pimobendan uygulamasının köpeklerde kalp yetmezliği progresyonunu önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir (Summerfield et al., 2012; Boswood et al., 2016).

C sınıfı: Bu sınıftaki hastalar hastanede acilen (akut) tedavi edilmesi gerekenler (C1 grubu) ve evde kronik tedavi alabilen hastalar (C2 grubu) olarak değerlendirilmektedir. C1 hastalarında ilk hedefin her zaman oksijenizasyonu arttırmak olduğu ifade edilmektedir. Solunum desteğinin sağlanmasına (oksijen takviyesi) ve/veya solunum güçlüğüne yol açan faktörlerin (plevral ve/veya perikardial efüzyon) minimal invazif yöntemlerle (torakosentez ve perikardiyosentez) ve medikal takviyelerle (furosemid)

ortadan kaldırılmasına gereksinim duyulmaktadır. Taşipnö ya da dispnö şikayeti olan hastalarda solunumun rahatlatılması için NO donörü ilaçların (nitroprussid vb.) ve hafif sedatiflerin (butorfanol 0.25 mg/kg, vb.) uygulanması da önerilmektedir (Fuentes, 2009). Köpeklerde özellikle DCM'de şiddetli pulmoner ödem ve düşük kardiyak output bulguları için kısa vadeli hedeflerde amaç oksijenasyonu ve doku perfüzyonunu iyileştirmek olmalıdır (Fuentes, 2009). Bu süreçte öncelikli strateji; hastanın durumunun stabilize edilmesi ve evde tedavi alabilir hale getirilmesidir (Keene et al., 2019).

Köpekler bazen hafifçe artan solunum çabası veya öksürük, zayıflık veya egzersiz intoleransı ile daha hafif KKY belirtileri gösterebilmektedir. Bu hastalar oral ilaçlarla ayakta ve evde hospitalize şekilde tedavi edilebilmektedirler. Evde tedavinin amacı; anormal sıvı tutulmasını (ödem) ortadan kaldırmak, nörohormonal aktivasyonu ve hemodinamik fonksiyonları düzenlemektir. Bu nedenle C2 hastalarında kronik (evde) tedavisi; ACE-i, furosemid (idame dozlarında), pimobendan ve dieter düzenlemeleri kapsamaktadır (Fuentes, 2009).

Kardiyak output özellikle DCM'li hastalarda azaldığı için hastanın kalp frekansını ve ritmini optimize ederek (örneğin ventriküler taşikardiyi sinüs ritmine dönüştürerek) pozitif inotropik ve/veya arteriyodilatörlerle yükseltilmesi önerilmektedir. Dobutamin kalp yetmezliklerinde hemodinamiği düzenlemek için geleneksel olarak tercih edilen bir pozitif inotropiktir ve bu seçimde beta reseptör aktivasyonu ile refleks taşikardi oluşturmadan kalp debisini yükseltebilmesi rol oynamaktadır (Tuttle et al., 1977). Dobutaminin sürekli infüzyon şeklinde uygulanabilme avantajı, bu ilacı akut ve acil tedavi gerektiren hastalar için (C1) ideal hale getirirken, C2 hastalar için öncelikli olarak pimobendan tavsiye edilmektedir. Pimobendan oral yoldan verildikten birkaç saat içinde pozitif inotropik etkilerin oluştuğu bildirilmiştir (Fuentes, 2009). Digoksin zayıf bir pozitif inotropik olarak bu amaçla kullanımı çok etkili görülmezken, atriyal fibrilasyonla seyreden KKY'li hastalarda vagal aktivasyonla kalp frekansının kontrol edilmesinde öncelik almaktadır (Gheorghide, & Ferguson, 1991).

Tablo 5: ACVIM klasifikasyonuna göre teşhis ve tedavi seçenekleri (Keene et al., 2019)

ACVIM Sınıflandırması	Teşhis	Tedavi
A sınıfı	Yılda 1 kez oskültasyon ve görüntüleme	İlaç ve diyet tedavisi önerilmez
B sınıfı	Torasik radyografi Kan basıncı ölçümü Ekokardiyografik muayene Serum biyokimyasal testler	B1; <ul style="list-style-type: none">Tedavi önerilmez1-2 ay sonra tekrar değerlendirme B2; <ul style="list-style-type: none">ACE-i kullanılması önerilir.
C sınıfı	Torasik radyografi Kan basıncı ölçümü Ekokardiyografik muayene Serum biyokimyasal testler Hastada öksürük gibi klinik bulgular gözlenebilir.	Akut Terapi; <ul style="list-style-type: none">Furosemid (1-4 mg/kg) tekralı bolusSuya erişim sınırlandırılmamalıPimobendan: 0,25-0,3 mg/kg PO G2KOksijen desteğiEğer var ise efüzyonların uzaklaştırılmasıStresli hastalara (butorphanol, buprenorphine veya düşük doz acepromazine) uygulanabilirSodyum nitroprusside Kronik Terapi; <ul style="list-style-type: none">Oral furosemid (hafif olgularda 1-2 mg/kg G2K, şiddetli olgularda 4-6 mg/kg G3K)Renal değerler ve elektrolitler monitorize edilirACE-i kullanılır (Enapril 0,5 mg/kg G2K)Pimobendan uygulanır (0,25-0,3 mg/kg G2K)
D sınıfı	C sınıfı ile benzer tanısal süreç izlenir, C sınıfında bulunup tedaviye cevap vermeyen hastalardır	Akut Terapi; <ul style="list-style-type: none">ACE-i ve Pimobendan kullanımı C sınıfı hastalardaki gibi önerilir.Azotemi yok ise furosemid miktarı arttırılabilir.Afterload düşürmek için;Nitroprusside: 0,5-1 µg/kg/minAmlodipine:0,05-0,1 mg/kgHydralizine: 0,5-2 mg/kg POUygulama öncesi ve 24-72. Saat sonrası kreatinin değeri ölçülmeliMekanik ventilatör uygulanabilir Kronik Terapi; <ul style="list-style-type: none">Konjesyon bulguları azalana kadar furosemid titre edilerek verilebilirDoz arttırdıktan 24-48 saat sonra kreatinin kontrol edilmeliSpirolakton (0,25-2 mg/kg) 12-24 saatte 1 kezKonjestif bulgular varsa B blokör kullanımından kaçınılır.

İnsanlarda ve küçük hayvan hekimliğinde pulmoner ödem, asites ve plevral efüzyonu ortadan kaldırmak için furosemid (1-5 mg/kg, günde 2-3 kez, PO/İV) uygulaması tedavinin temel dayanağı olarak kabul edilmektedir. Tüm anormal sıvı birikiminin ortadan kaldırılması için dozun ayarlanması, hatta gerektiğinde (şiddetli azotemi gelişene kadar) artan dozların uygulanması tavsiye edilmektedir. Bu ilaç kullanılırken aşırı tuz alımından kaçınılması da tedavinin etkinliği açısından değerli görülmektedir (Brater, Chennavasın, Seiwel, & Dallas, 1980).

Nörohormonal aktivasyonun düzenlenmesi için en önemli ilaçlardan biri ACE inhibitörleridir. Sodyum ve su tutulmasına yardımcı olmanın yanı sıra, ACE inhibisyonu yararlı vazodilatör etkilere ve potansiyel olarak da yararlı miyokardiyal etkilere neden olmaktadır. RAAS blokajına yardımcı olmak için ACE-i ile birlikte aldesteron blokörü spironolakton da tedaviye eklenebilmektedir (Middlekauff & Mark, 1998).

Hemodinamik fonksiyonun optimize edilmesi, kardiyak debiyi artırmak ve dolun basınçlarını azaltmak için pimobendan kullanılmalıdır. Ayrıca sitokin aktivasyonunu azaltarak da faydalı etkiler oluşturabilmektedir. Atriyal fibrilasyonda digoksin ventriküler cevabı kontrol etmek için yetersiz kaldığında; diltiazem veya bir beta-blokörün tedaviye eklenmesi tavsiye edilmektedir. Ventriküler aritmiler geliştiğinde ani ölüm riskinin yükseldiği belirtilmektedir. Böyle durumlarda meksiletin, sotalol veya beta-blokerin tedaviye eklenmesi, ancak bronkokonstrüktif etkilerinden dolayı beta-blokerlerin kullanılmasına dikkat edilmesi ve dozların yavaşça yukarı doğru titre edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Fuentes, 2009).

D sınıfı: Bazı hastalarda tedaviye rağmen sürekli klinik düzeyde KKY ile ilgili belirtilerin olması muhtemeldir. Bu hastalar da hastanede tedavi edilen (D1) ve evde idame edilebilenler (D2) olmak üzere iki alt grupta değerlendirilmektedir. D sınıfı hastalar pratikte daha çok C sınıfı olup tedavinin yetmediği ya da tedaviye rağmen hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkan hastaları kapsamaktadır. C sınıfı hastalardaki tedaviye ek olarak subkutan furosemid enjeksiyonlarının uygulanması, spironolakton ve

tiyazidler gibi diğer diüretik sınıflarının eklenmesi ve diyette agresif sodyum kısıtlaması gibi uygulamalar yapılabilir (Tablo-5). Ancak spironolakton ve tiyazidlerin kullanımı sırasında hastaların özellikle hiponatremi ve hipokalemiye karşı monitorize edilmesi unutulmamalıdır (Fuentes, 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Bursa Uludağ Üniversitesi (BUÜ) Yerel Etik Kurulu'ndan etik raporu alınmıştır (20.03.2018 tarih ve 2018-05/02 sayı). Çalışma materyalini 2018 – 2019 yılları arasında BUÜ Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine getirilen köpekler oluşturmuştur.

3.1 Hayvan Materyali ve Gruplar

Bu çalışmanın materyalini farklı ırk, yaş, vücut ağırlığı ve her iki cinsiyetten sorumluluğu hasta sahiplerinde olan toplam 29 köpek oluşturmuştur. Bu köpekler kardiyolojik inceleme temelinde ACVIM derecelendirme sistemine göre sınıflandırılmıştır (Keene et al., 2019). Bu bağlamda köpekler dört gruba ayrılmış; Grup I'de sağlıklı köpeklere (A Sınıfı, n = 8), Grup II'de asemptomatik kalp yetmezlikli köpeklere (B Sınıfı, n = 6), Grup III'te semptomatik kalp yetmezliği olan köpeklere (C Sınıfı, n = 10) ve Grup IV'te de (D Sınıfı, n = 5) standart kalp yetmezliği tedavisine direnç gösteren semptomatik olgulara yer verilmiştir. ACVIM sınıflandırması B grubu asemptomatik hastaları; mitral kapakta üfürümü olan ve radyolojik olarak kardiyomegalisi olmayan (B1 grubu) ya da olan (B2 grubu) olarak kabul etmektedir. Bu yaklaşım temelinde bu projede B grubu hastalardan sadece B2 olanları çalışmaya dahil edilerek Grup II oluşturulmuştur. Ayrıca C sınıfı KKY'li köpekler (Grup III) medikal tedaviyi takiben iki hafta sonra tekrar muayene edilerek; tedavi öncesi ve sonrası değerlendirmeye alınmışlardır.

3.2 Olguların Seçimi

Çalışmaya katılan tüm olguların seçiminde ACVIM kriterlerine göre hareket edilmiştir (Keene et al., 2019). A ve B sınıfları asemptomatik, C ve D sınıfları da semptomatik

hasta gruplarını oluşturmuştur (Tablo 6). Buna göre A sınıfı köpekler; sağlıklı ve kalp hastalıklarına predispoze olduğu bilinen ırklardan seçilirken (Serfass et al., 2006; Martin et al., 2009), B2 sınıfı köpekler; hasta sahiplerinin herhangi bir klinik şikayet bildirmediği (asemptomatik olan) ancak fiziksel muayenede kalp oskültasyonunda mitral kapakta üfürüm (1-3/6 dereceli), radyolojik olarak kardiyomegali (VHS > 10.5), ekokardiyografik olarak da MMVD veya DCM'ye bağlı kardiyomegali belirlenen olgulardan seçilmiştir. Radyolojik değerlendirmede VHS artışı spesifik ırk değerlerine göre yorumlanırken, referans bildirilmeyen ırklar için VHS > 10.5 değeri çalışma kapsamı için ideal kabul edilmiştir. Ekokardiyografide kardiyomegali; ırk ve canlı ağırlığa göre kalp boşluklarında varyasyonlar olduğundan LA/Ao >1.6 ve LVIDDN > 1.7 olması temelinde tanımlanmıştır (Strohm, Visser, Chapel, Drost, & Bonagura, 2018).

Semptomatik hasta grupları (C ve D sınıfları) için hasta sahibi şikayetlerinde öncelikli olarak son iki aylık periyotta öksürük, egzersiz intoleransı, taşipnö / dispnö ve abdominal distensiyon olması esas alınmış; mitral kapakta sistolik üfürüm ($\geq 3/6$ dereceli), görüntülü tanı teknikleri (VHS>11.0, LA/Ao >1.8 ve LVIDDN >1.8) ile de kardiyomegali varlığı konfirme edilenler C sınıfı olarak çalışma kapsamına alınmıştır. C sınıfı ekokardiyografik muayene ile MMVD (n=6) ve DCM'ye (n=4) bağlı kardiyomegali tanımlanan hastalardan oluşturulmuştur. Çalışma kapsamına alınan ve Grup I (A sınıfı), Grup II (B2 sınıfı) ve Grup III'de (C sınıfı) bulunan köpeklerde son bir ayda herhangi bir kardiyak ilaç ya da çalışma sonuçlarına etki edebilecek ürünlerin (kortikosteroidler, antibiyotikler vb.) kullanılmamış olmasına özen gösterilmiştir. Grup IV'de bulunan D sınıfı hastalar (n=5); MMVD (n=2) ve DCM'ye (n=3) bağlı olarak KKY gelişen olguları içermektedir. Bu grup; mitral kapakta şiddetli sistolik üfürüm (5-6/6 dereceli), prekordiyal pulzasyon (tril), abdominal distensiyon (ascites) ve radyolojik (VHS > 11.5) ve ekokardiyografik olarak kardiyomegali kriterlerini (LA/Ao > 1.6, LVIDDN >1.9) sağlamakla birlikte, tedaviye rağmen (pimobendan, furosemid, spironolakton, enalapril ve / veya diltiazem gibi bir anti-aritmik) özellikle furosemidin artan dozlarına (4 mg/kg, günde 2-3 kez, PO) olumlu yanıt veremeyen ve bu nedenle klinik şikayetleri devam eden refraktör (nüks eden) olguları kapsamaktadır. Dolayısıyla

bu grup hastalarda medikal uygulamaların proje kapsamındaki ölçümü düşünülen; serum sitokin, oksidatif stress ve proteomik panelini değiştirebileceğinden tedavi öncesi ve sonrası değerlendirmeler yapılmamıştır.

A sınıfı kontrol grubunu (Grup I) temsil etmektedir. Bu grubun materyali BUÜ Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi çalışanlarının ve öğrencilerinin sağlıklı köpeklerinden oluşturulmuştur. Bu amaçla köpeklerin klinik ve laboratuvar muayeneleri ile birlikte (kalp oskultasyonu, tam kan sayımı, serum cTnI ve rutin serum biyokimyasal profil) radyolojik ve ekokardiyografik incelemeleri yapılmış; sonuçları normal belirlenen olgular sağlıklı kabul edilerek çalışma kapsamına alınmışlardır.

Tablo 6: Grupların ACVIM derecelendirme sistemine göre dağılımı ve klinik, radyolojik ve ekokardiyografik (LA/Ao ve LVIDDN) bulgulara göre tanısal kriterleri

Grup	ACVIM	Klinik	Radyolojik	LA/Ao	LVIDDN
I	A sınıfı	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sağlıklı, predispoze ırklar 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ VHS < 10.5 	< 1.6	< 1.7
II	B sınıfı	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aseptomatik ▪ MPM'da üfürüm 1-3/6 derece 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ VHS > 10.5 	> 1.6	> 1.7
III	C sınıfı	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Semptomatik: Geçmişte ve halen KKY bulguları ▪ MPM'da üfürüm >3/6 derece 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ VHS > 11.0 ▪ Pulmoner ödem 	> 1.8	> 1.8
IV	D sınıfı	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Semptomatik ▪ KKY tedavisi alan nüks hasta ▪ MPM'da üfürüm (5-6/6 dereceli) ve Prekordiyal tril ▪ Ascites ve Jugular dolgunluk 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ VHS > 11.5 ▪ Pulmoner ödem ▪ Plevral ödem ▪ Perikardial ödem ▪ Peritoneal ödem 	> 1.9	> 1.9

3.3 Çalışmadan çıkarma kriterleri

Bu çalışmanın materyal toplama aşamasında gruplara dâhil edilme potansiyelinde olan hastalarda, çalışma amacına yönelik spesifik muayene ve analizler yapılmış, ayrıca eşlik eden veya altta yatan hastalıkların belirlenmesi için gerekli tanısal yaklaşımlar

gösterilmiştir. Bu kapsamda enfeksiyöz (pnömoni, alt üriner sistem hastalıkları, pyoderma vb.) ve enfeksiyöz olmayan hastalıklar (böbrek yetmezliği, atopi, yangısal bağırsak hastalığı, hepatitis vb.), vektör kaynaklı hastalıklar (lyme, ehrlısyozis, anaplazmozis, dirofilariasis, leishmaniasis), endokrin hastalıklar (diyabetes mellitus, hipertiroidizm, cushing sendromu vb.) ve deri ya da iç organlardan köken alan tümöral oluşumlara sahip olgular çalışma kapsamından çıkarılmıştır. Sağlıklı olduğu belirtilen ve Grup I (A sınıfı, kontrol grubu) için düşünülen köpekler; yukarıda belirtilen hastalıklar yönünden taranmakla birlikte klinik forma (pre-klinik) dönüşmemiş CVHD, DCM, MVP veya kongenital kalp hastalığı bulunduğu çalışma kapsamından çıkartılmıştır.

3.4 Örneklerin toplanması ve ölçümü

3.4.1. Klinik Muayene: Çalışma materyali aynı zamanda hayvan hastanesinin rutin sorumluluğunda olduğu için standart klinik tanı ve tedavi prosedürleri uygulanmış; verileri kayıt altına alınmıştır. Bu çalışmanın amaçlarına uygun olarak; vücut ısısı, kalp ve solunum sayıları ve kardiyak oskültasyon bulguları öncelikli görülerek çalışma kapsamına alınmıştır.

3.4.2. Radyolojik muayene: Hastalar klinik muayeneyi takiben kardiyo-pulmoner sistem şikayetleri (öksürük, ekzersiz intoleransı vb.) ve/veya mitral punkta maksimada alınan üfürüm nedeni ile torasik radyolojik muayeneye yönlendirilmiştir. Her hastanın lateral, ventro-dorsal veya dorso-ventral grafileri çekilmiş; kalbin radyolojik morfolojisi, VHS, akciğer ve torasik damarlar incelenmiştir. KKY'nin tanımlanması için önerilen radyografik kompozit skor kullanılmıştır (Tablo 7) (Schober et al., 2010).

3.4.3. Elektrokardiyografik (EKG) muayene: Bu muayenenin yapılabilmesi için gerekli şekilde düzenlenmiş EKG ve ekokardiyografi ünitesi kullanılmıştır. Bipolar ve unipolar ekstremitte derivasyonları önerildiği gibi hastalara uygulanmış, bu süreçte hiçbir hastaya sedatif ilaç verilmemiştir. Kardiyak ritim analizleri ile EKG dalga ve aralık ölçümleri standart bir kalibrasyonla ikinci derivasyondan gerçekleştirilmiştir (10 mm / mV, 50 mm / sn, DII) (Ware, 2011) (Şekil 5).



Şekil 6: Elektrokardiyografi uygulaması ve elektrotların bağlanması

Tablo 7: Radyolojik bulguların varlığı ve şiddetine göre skorlandırılarak konjestif kalp yetmezliğinin (KKY) belirlenmesi (Schober et al., 2010' dan modifiye edilmiştir).

Radyolojik bulgu	Derecelendirme	Skor
Sol atriyal büyüme	Yok	0
	Hafif	1
	Orta – şiddetli	3
Pulmonary venöz konjesyon	Yok	0
	Var	3
Kardiyojenik ödemle uyumlu	Yok	0
Pulmoner infiltrat	Hafif interstitial	1
	Diffüz interstitial	2
	Alveolar	3
Pleural efüzyon	Yok	0
	Var	1
Vena cava dilatasyonu ve dorsale deviasyonu	Yok	0
	Var	1
Tracheanın dorsale deviasyonu	Yok	0
	Var	1
Sonuç	Skor 0-2 Skor 3-4 Skor >4	KKY olası değil KKY olası KKY muhtemel

3.4.4. Ekokardiyografik muayene: Bu muayene sedasyon uygulamaksızın gerçekleştirilmiştir (Şekil 6). Transtorasik ekokardiyografi ile kardiyak ölçümler elde edilmiş; bu amaçla standart yöntemler (iki boyutlu, M-modu ve renkli Doppler) ve görüntüleme teknikleri (sağ parasternal kısa ve uzun eksen, sol apikal 4-5 boşluk ve subkostal pencereleri) kullanılmıştır. Köpeklerin göğüs yapısı ve canlı ağırlıklarına göre kardiyak phase array prob seçimleri de yapılmıştır; 2.5 – 5 MHz (büyük ırk), 5.0 - 7.5 MHz (büyük ve orta büyüklükteki ırklar) ve 8 - 10 MHz (orta ve küçük ırklar) (Caris Plus Esaote, İtalya ve Hitachi Aloka Arietta V70, Japonya) (Boon, 2011) .



Şekil 7: Ekokardiyografi muayenesinin uygulanması

Ekokardiyografik muayeneye başlamadan önce köpeklerin sağ ve sol kardiyak apeks noktaları ile birlikte subkostal muayene için ksifoid bölgesi yaklaşık 5 cm boyunda traş edilmiş ve iletkenliği arttırmak için bölgeye alkol ve ultrason jeli uygulanmıştır (Boon, 2011).

İki boyutlu (2-D) ekokardiyografi: Sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyinden 2-D ekokardiyografi ile LV, papillar kaslar, IVS ve RV yapıları incelenmiş, bunların geometrik ve fonksiyonel ölçümleri not edilmiştir. Bu görüntüde sistol ve diyastolde kardiyak geometri olarak LV boyutu, IVS ve LVFW ölçülürken, fonksiyonel olarak sistol ve diyastol sonu LV volümü, %FS ve %EF değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır (Şekil 7) (Boon, 2011).

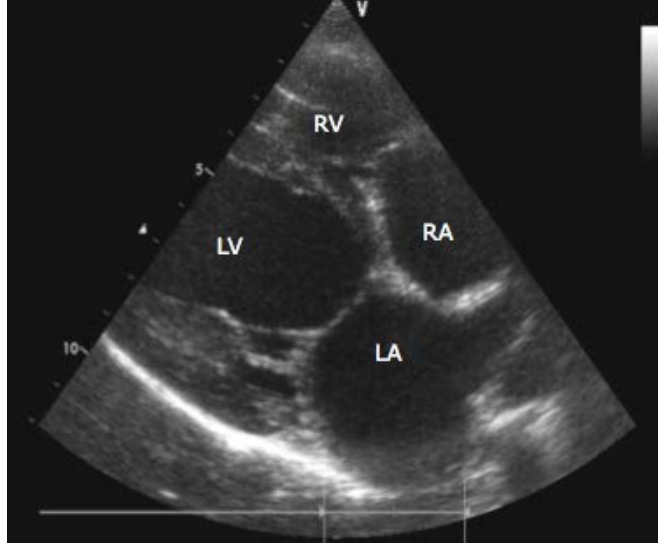


Şekil 8: Sol: Sağ parasternal kısa eksen (RPSA) aort düzeyinden sol atriyal, aort ve pulmoner arter çap ölçümleri (A sınıfı 4 nolu köpek, 4 yaş, erkek, 14 kg). Sağ: RPSA papillar kas düzeyinde sol ventrikül M-mode ölçümü (C sınıfı 7 nolu hasta, CKCS, 5 yaş, dişi, 11,5 kg).

Aynı pozisyonda probun açısı değiştirilerek kısa eksen aort düzey görünümü elde edilmiştir. Bu görüntü ile Ao, LA ve MPA çapları ölçülmüş, LA/Ao oranı hesaplanmıştır. İdeal ölçüm için Ao'un dairesel olarak görüntü penceresinin merkezinde ve koroner / non-koroner kapakçıklarının belirgin izlenebilir olduğu (ters Y görünümü) nokta seçilmiş, LA'un saat 6-7 ve MPA'nın saat 3-4 yönüne düşürülmesine özen gösterilmiştir (Şekil 7).

Sağ parasternal pozisyonda kısa eksen görünümü takiben, probun sola doğru (saat yönünde) rotasyonu ile uzun eksen 4-5 boşluk görünümüne geçilmiştir (Şekil 8). Bu görüntüleme ile atriyumlar ve ventriküller ile birlikte Ao'un değerlendirilmesine olanak sağlanmıştır. LA'nın sirküler ve mitral kapak açılımın iki fazlı olarak izlenebildiği pencere ideal olarak kabul edilmiştir. Bu pencerede ölçüm öncesi IVS'nin LVFW'ye

paralel olmasına özen gösterilmiştir. MMVD ve DCM saptanmasında kısa ve uzun eksen görüntülerinden yararlanılmıştır. Hasta gruplarında uzun eksen görünümde LA ile bağlantılı olan damarsal yapılar da izlenmiştir. Bu amaçla pulmoner ven ve pulmoner arter çaplarının ölçülebileceği görüntüler elde edilmiştir.



Şekil 9: Sağ parasternal uzun eksen 4 boşluk görüntüsü; sağ ve sol atriyum ve ventriküller (Sağlıklı kontrol 5, Labrador, Erkek, 4yaş, 35 kg).

2-D ekokardiyografik muayeneye apikal 4-5 ve subkostal muayenelerle devam edilmiştir. Apikal yaklaşımda kalbin bazisine (atriyumlar) görüntünün altında, apeksine (ventriküller) ise üstte ve her iki yapı da doğru bir hatta olacak şekilde pozisyon verilmiştir. Böylece sağ ve sol atriyum ve ventriküller çapsal ve volümetrik olarak değerlendirilebilmiştir. Subkostal pencerede özellikle Ao kök ve LV çıkışın (LVOT) değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu pozisyonda yine Ao akım karakteristiği renkli Doppler ile ölçülmüştür (Şekil 9c).

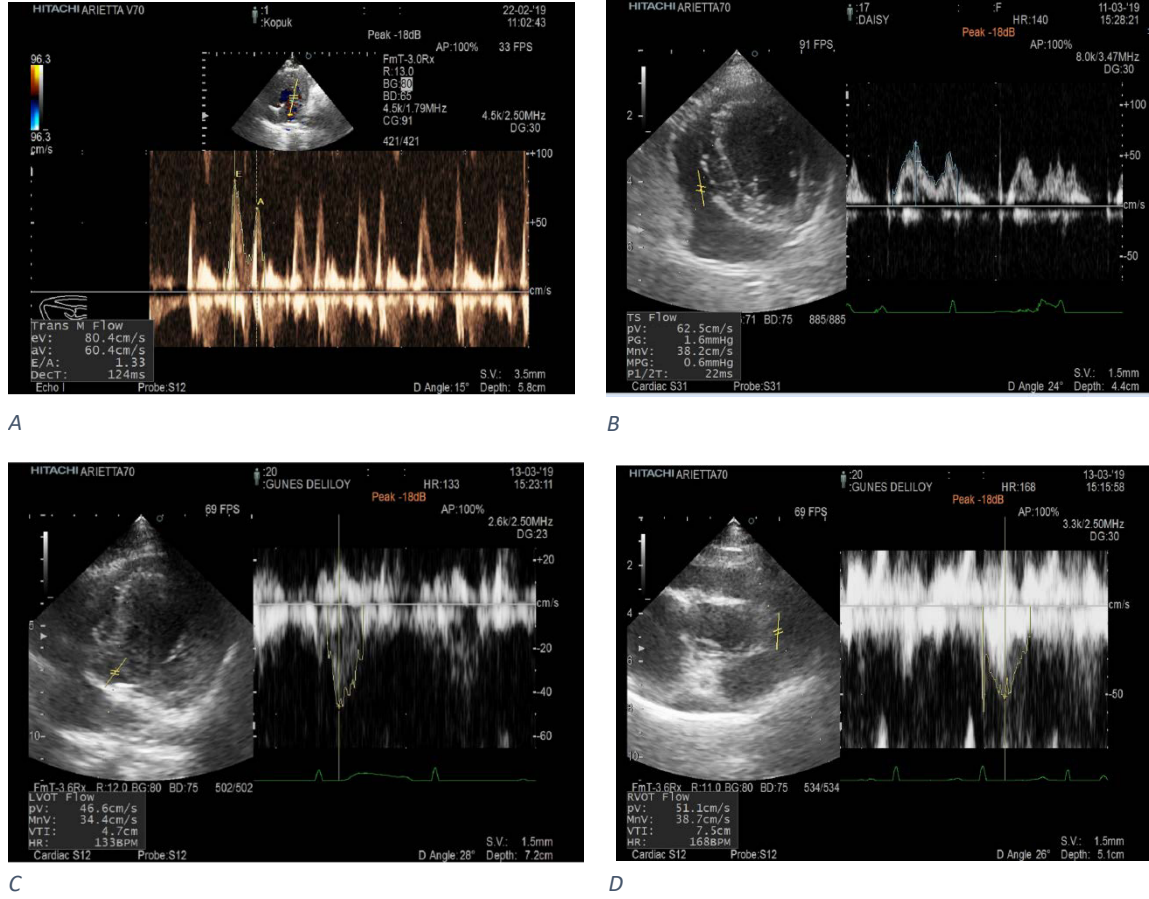
M-mode ekokardiyografi: Sağ parasternal kısa ve uzun eksen görüntülerde çapsal ölçümler için kullanılmıştır (Şekil 5). Kısa eksen görüntüde ultrason çizgisine papillar kasların tam ortasından geçecek şekilde pozisyon verilmiş, M-mode butonu ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla; RV, IVS, LV ve LVFW'nin önce diyastolik, takiben de sistolik çapları ölçülmüştür. Uzun eksen görüntüleme ultrason çizgisi IVS ve

LVPFW'yi doksan derecede ve mitral kapak açılımının tepe noktasından geçecek şekilde yerleştirilmiş ve sırasıyla RV, IVS, LV ve LVPFW diyastol ve sistol çapları incelenmiştir. Böylece kısa eksen M-mode ölçümleri, uzun eksen ölçümleri ile doğrulanmıştır. M-mode ile diyastolik fonksiyon göstergesi olarak kullanılan mitral anterior kapağın son diyastolde septuma olan uzaklığını gösteren EPSS değeri manuel olarak hesaplanırken, miyokardiyal kasılma fonksiyonları olan fraksiyonel kasılma (% FS) ve ejeksiyon fraksiyonu (% EF) otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmıştır.

Sağ parasternal 2-D kısa eksen Ao düzey görüntülemeye ultrason çizgisi Ao ve LA'nın ortasından geçirilerek LA/Ao oranı da hesaplanmıştır. Ao çapı sistolde, LA çapı da diyastolde ölçülmüştür. Apikal görüntüde sistolik fonksiyonların değerlendirilmesi için ultrason imleci önce mitral anterior, sonrasında da trikuspid posterior kapağın üzerinden 90 derecelik açıyla geçirilerek M-mode aktif hale getirilmiştir; böylece sırasıyla mitral annular plane systolic excursion (MAPSE) ve triküspid annular plane systolic excursion (TAPSE) olarak isimlendirilen parametreler ölçülmüştür. Çalışma materyalinde subkostal pozisyonda Ao ve caudal vena cava (CVC) çapları değerlendirilmiştir. Diyastolik fonksiyon göstergelerinden biri olan CVC çap ölçümü; ekspirasyon ve inspirasyonda gerçekleştirilmiştir (Boon, 2011).

Renkli Doppler ekokardiyografi: Kalp içinde kanın akış yönünü değerlendirmek için renkli Doppler ekokardiyografi tekniği kullanılmıştır. Bu yaklaşımla kalp kapakları (MV ve TV) ile damar kapakçıklarında (Ao ve MPA) kaçak (regürgitant) akımların varlığı araştırılmıştır. MPA incelemesi için sağ parasternal Ao düzey kısa eksen görüntüsü tercih edilmiş; renkli akım görüntüsü alınarak laminar ya da türbülant (regürgitant) akımlar araştırılmıştır (Şekil 10). MPA'nın akım karakteristiğini belirlemek için ultrason çizgisi MPA kapakçıkları üzerinden dik açı oluşturacak şekilde geçirilirken ultrason imleci kapağın hemen proksimaline odaklanmış; önce sürekli dalga akımı (continuous wave - CW) sonrasında atım dalga akımı (pulsed wave - PW) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. MPA'nın Doppler akım görüntüsü ekrana çizginin altında çıkarken, regürgitant akımların varlığı için üst tarafta da diyastol sırasında ters yönlü akım olması

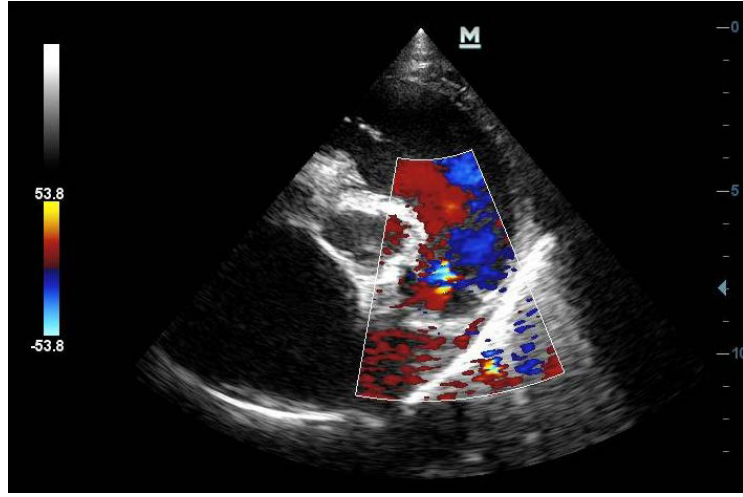
esas alınmıştır. MPA'nın maksimal velositesi (PAVmax) ve sağ ventriküler ejiaksiyon zamanları (RVET) tavsiye edilen şekliyle elde edilmiştir (Boon, 2011).



Şekil 10: Kapak ve damar akım karakteristikleri; apikal 4-5 boşluk görünümünde mitral (A), triküspid (B), aort (C) ile sağ parasternal kısa eksen görünümünde pulmoner arter velosite ölçümleri (D)

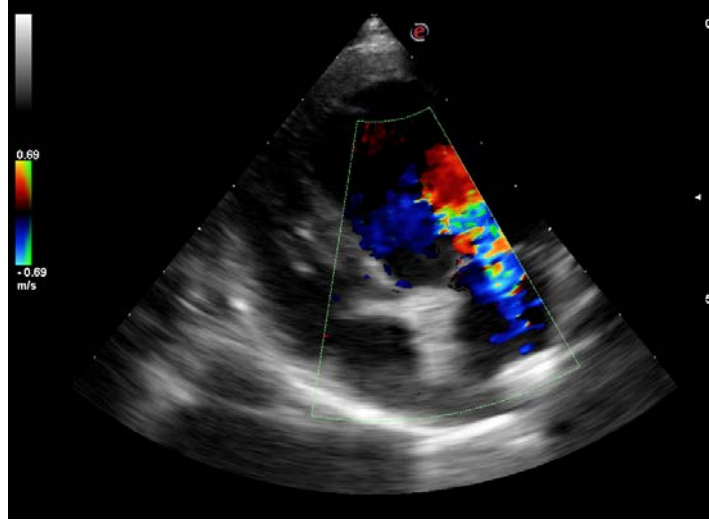
MV, TV ve Ao kapakçıklarının renkli Doppler akım değerlendirmeleri için sol apikal 4 ve 5 boşluk görüntüleri kullanılmıştır. Ultrason imleci MV ve TV'nin tepe noktasına konularak CW ve PW modunda ölçümler gerçekleştirilmiştir. Görüntülerde baseline çizginin üstünde diyastol sırasında MV ve TV'nin normal yönlü akımları, çizginin altında da varsa sistol sırasında regürgitan akımlar incelenmiştir. Normal akımlarda iki tepeli görüntülerde ilk olanı E dalgası olarak (EKG eşliğinde T dalgasını takip eden),

ikincil olarak da E dalgasından normalde daha küçük görünen A dalgası (EKG eşliğinde P dalgasının başlangıcını takiben) olarak ölçülmüştür. E ve A dalgalarının taranması ile E ve A'nın maksimal velositeleri ve oranları (E/A) otomatik olarak hesaplanmıştır. E/A oranları ile hastanın diyastolik fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olunmuştur (Boon, 2011).

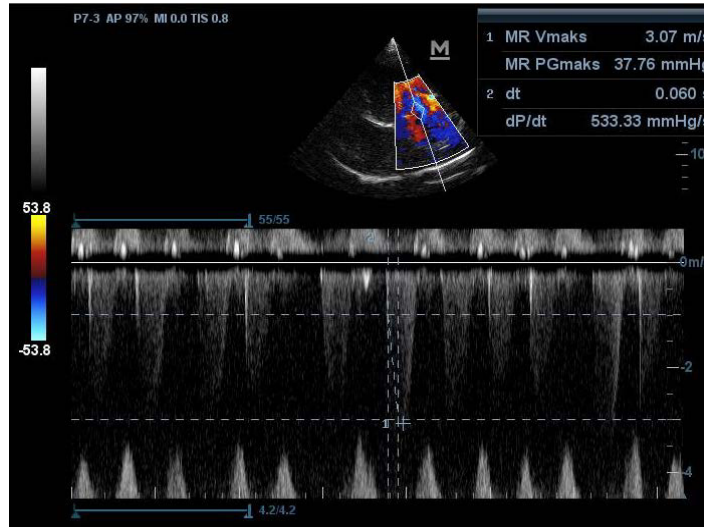


Şekil 11: B2 sınıfı kalp yetmezliği olgusunda pulmoner arterin renkli Doppler muayenesi ve sol atriyal dilatasyon görünümü (Kopay, 4 yaş, Dişi, 21 kg).

Regürgitan akımların değerlendirilmesi: MV ve TV'ye ait regürgitan akımların belirlenmesi apikal 4 boşluk görüntüde; kapak açılımlarının net şekilde izlendiği durumda (Şekil 11), ultrason imlecinin kapağın alt kısmına yani sırasıyla LA ve RA içine doğru yerleştirilmesi ve regürgitan akım yolu üzerine paralel düşülmesi ile gerçekleştirilmiştir. CW ve PW Doppler ölçümlerinde regürgitan akımın velositesi de değerlendirilmiştir.



Şekil 12: Apikal görüntü, mitral kapağın renkli akım ile muayenesi (Kopay, 4 yaş, Dişi, 21 kg, B2 hastası)



Şekil 13: Renkli akımın takip edilmesiyle CW Doppler modu ile mitral regürjitasyon velositesinin ve dp/dt oranının belirlenmesi.

Apikal 5 boşluk görüntüde LV'de aortik çıkışının net şekilde görünür hale geldiği pozisyonda akıma paralel pozisyonlandırılan ultrason imleci ile Ao akım karakteristiği değerlendirilmiştir; maksimum velosite (Ao Vmax) ve LV ejeksiyon zamanları (LVET) ölçülmüştür. Hastalarda ekokardiyografide son olarak subkostal pozisyonda Ao ölçümü yapılırken ultrason imleci akıma paralel olarak yerleştirilmiş ve daha önce farklı pencerelerden ölçülmüş olan maksimum akım hızı (Vmax) ve LVET değerleri doğrulanmıştır (Boon, 2011).

3.4.5. Non-invazif Tansiyon Ölçümü

Tansiyon ölçüm işlemleri hastaların stres koşullarının en az olduğu durum ve ortamda sağ ve sol pedal arterlerden ölçülmüştür (VMed Vet-Dop2, Amerika Birleşik Devletleri). Ölçüm yapılmadan önce hastaların sağ veya sol arka ayaklarında pedal arterin üst kısmına gelen kısmı yaklaşık 3 cm boyunda traş edilmiştir. Hastanın boyutuna göre uygun olan kaf, hayvanın tarsal eklemine üst kısmı takılmıştır. Cihazın probu hastanın pedal arterinin üzerine yerleştirilerek sistolik ve diyastolik sesler duyulduktan sonra ölçüm işlemine başlanmıştır, 5 kez seri ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin ortalaması alınarak hastanın gerçek tansiyon değerine ulaşılmıştır (Mandigers, 2005).



Şekil 14: Non-invazif Doppler tansiyon ölçümü uygulaması

3.4.6. Laboratuvar Analizleri: Bu analizler tam kan sayımı ile birlikte serum biyokimyasal ölçümlerden (karaciğer – böbrek ve elektrolit paneli, akut faz proteinleri (APPs), D vitamini, d-dimer, oksidatif stres belirteçleri ve sitokin panelinden) oluşmuştur. Kan örnekleri uygun teknikle köpeklerin sefalik venlerinden hemogram için antikoagülanlı (EDTA), serum biyokimyasal ölçümler için de antikoagülanlı tüplere toplanmıştır.

APPs, oksidatif stres belirteçleri ve sitokin paneli çalışma kapsamında hizmet alımı ile daha önce benzer çalışmaları yaptığımız ekip (Prof. Dr. Jose Joaquin Ceron, Murcia Üniversitesi, Klinik Patoloji Laboratuvarı, Murcia – İspanya) tarafından gerçekleştirilmiştir. Serum proteomik analizler de benzer şekilde hizmet alımı ile bu konularda ortak çalışmalar yürüttüğümüz ekip (Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal, Acıbadem Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, İstanbul) tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.4.6.1. Hematoloji: Kan örnekleri alınmasını takiben Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarında bir saat içinde (HM5, Abaxis) tam kan sayımı (lökogram, eritrogram ve trombogram) gerçekleştirilmiştir.

3.4.6.2. Serum Biyokimyasal Analizler: Tüm köpeklerde serum enzim aktiviteleri (alkalin fosfataz, alanin aminotransferaz, kreatinin kinaz ve amilaz), proteinler (albümin, globulin, toplam protein), elektrolitler (Ca, P), renal hasar belirteçleri (kan üre azot ve kreatinin), glukoz ve total bilirubin ölçümleri belirlenmiştir (Kapsamlı Tanı Profili Rotor, VetScan VS2, Abaxis). Bununla birlikte tiroid paneli olarak serum tiroksin ve kolesterol düzeyleri (VetScan T4 / Kolesterol Reaktif Rotor, Abaxis), serum miyokardiyal hasar belirteci olarak da kardiyak troponin I ölçümleri (I-Stat, cTnI kartuşu, Abaxis) gerçekleştirilmiştir.

3.4.7. İnflamatuvar belirteçler

3.4.7.1. Serum sitokin analizleri: Bu analizler için otomatik analizör kullanılmıştır (Luminex 200, Luminex Corporation, Austin, TX). Bir örnekte aynı anda 13 sitokin ölçümü yapılmıştır (Milliplex® MAP paneli, CCYTO-90K Millipore, Billerica, MA). Bu sitokinler; interlökin-2 (IL-2), IL -6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, interferon gama

kaynaklı protein 10 (IP-10), monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), keratinosit türevli kemokin (KC like), tümör nekroz faktörü - alfa (TNF- α) ve interferon - gama (IFN- γ) olmuştur. Analizler üretici firmanın prospektüs bilgileri temelinde gerçekleştirilmiştir.

Sitokin analizlerinin işlem basamakları şu şekilde gerçekleşmiştir. Kitin her bir hücreesine 200 μ L test tamponu eklenip karıştırılarak 10 dakika boyunca 20-25 ° C'de bekletildikten sonra test tamponu ve artıkları emici bir havlunun üzerine kit ters çevrilerek çıkartılmıştır. Her bir kit hücreesine kontrol ve test örneklerinden 25 μ L konulduktan sonra 25 μ L test tamponu ve örnek türüne göre (kontrol ve test) uygun matris çözeltisinden 25 μ L numunelerin üzerine eklenmiştir. Serum örneklerini test ederken, matris çözeltisi olarak uygun kontrol kültür ortamı kullanılmıştır. Kit hücrelerine 25 μ L serum örneği daha eklerken aynı anda vorteks karıştırma şişesine 25 μ L boncuk eklenmiş ve ekleme işlemi sırasında şişe sürekli karıştırılmıştır. Ardından kitin her bir hücresi mühürleyici ile kapatılmış ve kit folyo ile sarılarak 16-18 saat boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Bir gecelik inkübasyon bazı analitler için test hassasiyetini artırabildiği için farklı iki prosedür uygulanmıştır. Kitler inkübasyondan alındıktan sonra uygun talimata göre 2 kez yıkama yapılmıştır. Kit oda ısısına gelene kadar beklendikten sonra kitin hücrelerine 25 μ L saptama antikoru eklenmiştir ve kit folyo ile kaplanarak 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. İçerisinde daha önceden eklenmiş 25 μ L saptama solüsyonu bulunan her bir hücreye 25 μ L Streptavidin-Phycoerythrin eklenmiş, 30 dakika boyunca hafifçe çalkalayarak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra kit yeniden uygun talimata göre 2 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra tüm hücrelere 150 μ L sheath solüsyonu eklenerek boncuklarla birlikte 5 dakika boyunca çalkalanarak oda sıcaklığında süspanse edilmiştir. Kit Luminex® 200 yazılımı ile okunmuş, örneklerdeki analit konsantrasyonları 5 parametrelili bir lojistik yöntem kullanarak Median Floresan Yoğunluğu (MFI) elde edilmiştir. Sitokinlerin ölçülebilir değerleri 3,2 - 21,7 μ L arasında değişiklik gösterirken, testin doğruluğu da sitokinler arasında farklılık (%91 - %109) göstermiştir .

3.4.7.2. Akut Faz Proteinleri (APPs): APPs olarak bu çalışmada serum örneklerinde CRP, Hp ve ferritin düzeyleri belirlenmiştir. CRP ölçümleri immünoturbidimetrik analiz kiti (CRP OSR6147 Olympus, GmbH, Almanya) ve cihazı ile (Olympus AU600, Olympus Diagnostica GmbH) gerçekleştirilmiştir. Ferritin konsantrasyonu ticari bir immünoturbidimetrik analizi (Tina-quant Ferritin, Roche) kullanılarak ölçülürken, Hp konsantrasyon ölçümünde ticari olarak temin edilebilen bir yöntem (Tridelta Ltd., Brey, Ireland) kullanılmıştır (Eckersall et al., 1999).

3.4.7.3. Oksidatif stres belirteçleri: Bu amaçla serumda kuprik indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC), trolox eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) ve tiol düzeyleri irdelenmiştir. CUPRAC ve TEAC düzeyleri köpekler için valide edilmiş yöntemlerle analiz edilmiştir (Rubio et al., 2016a, 2016b). Serum tiol konsantrasyonları ise Jocelyn (1987) tarafından geliştirilen, Costa et al. (2006) tarafından modifiye edilen teknik ile ölçülmüştür.

TEAC testi; bir numunede bulunan antioksidanların testte üretilen oksitli ürünleri azaltma veya inhibe etme kabiliyetine dayanmaktadır. Bu testin alt yapısı; ABTS'nin (2,2'-azino-bis (3-etilbenz-tiazolin-6 sülfonik asit) uygun bir kimyasalla inkübe edilmesini takiben bir ABTS radikalinin oluşturulması esasına dayandırılmaktadır. Örnekteki antioksidanlar konsantrasyonları ile orantılı bir şekilde ABTS'yi azaltarak renk üretimlerinde (mavi – yeşil) değişime yol açmaktadırlar. İnsan plazmasında TEAC ölçümleri esas olarak albümin ve ürik asidi kapsarken, buna ek olarak; askorbik asit, alfa-tokoferol ve bilirubin de dâhil olmaktadır. Reaksiyon hızı genellikle E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox ile kalibre edilmekte ve analiz sonuçları da mmol Trolox eşdeğeri / L cinsinden ifade edilmektedir (Rubio et al, 2016c). Toplam serum tiyol konsantrasyonu da Hu (1994) tarafından modifiye edilen yöntem ile otomatik bir biyokimya cihazı (COBAS MIRA® Plus) ile değerlendirilmiştir.

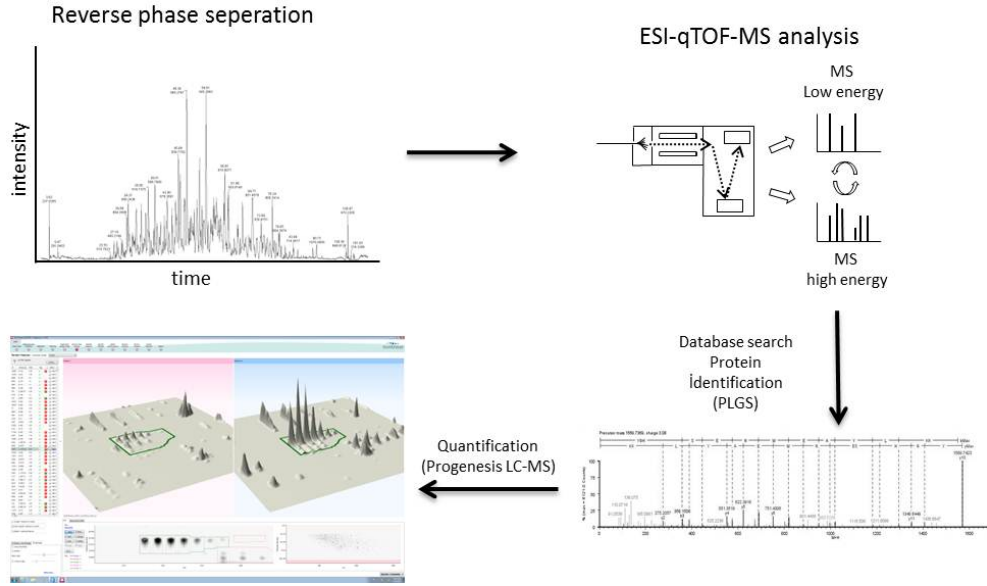
3.4.7.4. Paraoksonaz 1 (PON-1) ve butirilkolinesteraz (BChE) aktivitesi: PON-1 ve BChE aktiviteleri daha önceki çalışmalarımızda olduğu gibi köpekler için valide edilmiş yöntemlerle ölçülmüştür. BChE aktivitesinin ölçümünde Tecles et al. (2000) tarafından tavsiye edilen yöntem kullanılmış (Olympus AU2700, Olympus Diagnostica GmbH) ve

analiz için DTNB ve 2-PDS adında iki farklı kromofor kullanılmıştır. BChE aktivitesi; hidrolize substrat / mL numune / dakika mikromol olarak ifade edilmiştir. Hesaplama şu şekilde yapılmıştır: 2 PDS için, son aktivite = $340 \text{ nm} \times 1.55 \times$ ilk seyreltmede absorbans / dakika değişim, DTNB için ise son aktivite = $405 \text{ nm'de} \times 0.808 \times$ başlangıç seyreltisinde absorbans / dakika değişimi formülleri kullanılmıştır (Tecles et al., 2000; Tvarijonaviçute et al., 2012). PON-1 aktivitesi de tavsiye edilen ölçüm metodu (Haagen, & Brock, 1992) temelinde arilesteraz aktivitesinin ölçülmesi ile belirlenmiştir.

3.4.8. Proteomik analizler: Bu analizler bir önceki çalışmalarımızın önderliğinde gerçekleştirilmiştir (Kocatürk ve diğerleri, 2016; Levent ve diğerleri, 2020). Protein ekstraksiyonu için hücre pelleti; Universal Protein Extraction Kiti (Expedeon-44101) ve proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Sci.-87785) ile karıştırılmıştır. Örnekler 5×10 saniye döngüye tabi tutulmuşlar ve döngüler arasında da 30 sn buz üstünde soğutulmuşlardır (sonikasyon). Bu işlem sonrasında örnekler önce 1000 rpm hızda, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de / 10 dakika karıştırılarak ısıl işleme tabi tutulmuş, takiben de 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant örnekler alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Peptitlerin elde edilmesi için; FASP Protein Digestion Kit (Expedeon-44250) ve tripsin enzimi (Pierce-90057) kullanılmıştır. Örneklerin son konsantrasyonu $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ olacak şekilde % 0,1 formik asit ile dilue edilmiş ve cihaza uygun tüplere aktarılmıştır.

Analizlere başlamadan önce, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS Q TOF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı (V4.1-Waters) aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları yapılmıştır. Metot SONAR'ın pozitif iyon ve sensitif moduna getirilmesini takiben triptik peptitler hidrofobik yapılarına göre HSS-T3 (Waters-186008818) kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlanmıştır. Asetonitril % 5-35 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlanmış, elektrospray iyonlaşması sonucu da kütle spektrometresinde analizi yapılmıştır. Analiz esnasında 50-1950 m/z aralığında ki peptitler için veriler toplanmıştır. Bu sayede MS analizi gerçekleştirilerek peptidin bütünü hakkında bilgilere ulaşım sağlanmıştır (Şekil 14). Ardından MS/MS analizi yapıp peptidler parçalanmış ve sekans bilgileri elde edilmiştir. Protein tanımlamaları yapılırken UniProt protein veri bankasındaki canis lupus familiaris'e ait

protein sekans bilgisi kullanılmıştır. Progenesis QIP yazılımı (Waters-2018) kullanarak protein tanımlaması ve istatistiksel analizler yapılmıştır.



Şekil 15: Bu çalışmada kullanılan proteomik analiz (LC/MS) algoritması

3.4.9. Örneklerin saklanması: Serum örnekleri -80 derecede ependorf ve cryo tüplerde saklanmıştır. Tüm gruplardaki materyal sayıları tamamlandığında örneklerin kuru buz ile birlikte hizmete diğerlerini yapılan İstanbul Acıbadem Üniversitesi Moleküler Biyokimya laboratuvarına elden ve Murcia Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Patoloji Laboratuvarına kargo aracılığı ile gönderilmiştir.

3.4.10. İstatistiksel Analizler: Veriler ticari bir yazılım aracı kullanılarak analiz edilmiştir (GraphPad Prism 6 ve SigmaPlot 12.0, GmbH, Germany). Farklı gruplar arasındaki sonuçlarda meydana gelen değişiklikler, küçük örneklem büyüklüğü nedeniyle parametrik olmayan bir test (Kruskal-Wallis ve ardından Dunn'ın çoklu karşılaştırması) ile değerlendirilmiştir. C sınıfı hastalarda tedavi öncesi ve sonrası verileri karşılaştırmak için Wilcoxon testi kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki korelasyon Spearman testi kullanılarak belirlenmiştir. Tüm olgularda en az $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Proteomik analizlerde protein

identifikasyonu ve istatistik analizleri Progenesis QIP software (Waters-2018) ile yapılmış; kontrole göre enaz 1.2 kat değişim (artma ya da azalma) gösteren ve $P < 0.05$ düzeyde istatistik farklılığa sahip olan proteinler anlamlı olarak kabul edilmiştir (Kocatürk ve diğerleri, 2016).

Biyoinformatik analizlerde çalışmada elde edilen proteinlerin birbiri ile olan moleküler – biyolojik ilişkileri bilgisayar ortamında kullanımı serbest olan programlar aracılığı ile (www.string-db.com) gerçekleştirilmiş, aynı programda figürleri oluşturulmuştur. Proteinlerin yolak analizleri ve özellikleri bir diğer programda (www.pantherdb.org) çalışılmıştır (Levent ve diğerleri, 2020).

4. BULGULAR

Bu çalışma farklı kalp yetmezliği sınıfında yer alan köpeklerin klinik ve laboratuvar bulgularını içermektedir. Dolayısıyla bulgular; ACVIM kalp yetmezliği klasifikasyonuna göre oluşturulmuş gruplardaki (A, B2, C ve D) değişimler temelinde aktarılmış, ayrıca C grubu hastaların tedavi öncesi ve sonrası bulgularına yer verilmiştir. A grubu köpekler sağlıklı kontrol grubunu, diğerleri (B2, C ve D sınıfları) ise hasta köpekleri yani test gruplarını temsil etmektedir. Bu çalışmada farklı ırk, yaş ve cinsiyetten toplam 29 köpek kullanılmıştır (Tablo 8).

Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen köpeklerin ırk dağılımları ve ACVIM sınıfları

İrk	n	ACVIM sınıfı
Labrador	3	A
Border Collie	2	
Samoyed	1	
Cavalier King Charles Spaniel	1	
Kangal	1	
Golden Retrievers	2	B2
Cocker Spaniel	1	
Kopay	1	
Jack Russell	1	
Shih Tzu	1	
Kangal	3	C
Pekingeses	2	
Terriers	2	
Shih Tzu	1	
Cavalier King Charles Spaniel	1	
Pincher	1	
Kangal	2	D
Cocker Spaniels	1	
Pit Bull	1	
German shepherd	1	
Toplam	29	

4.1. Klinik bulgular: Çalışmaya dahil edilen köpeklerin semptomatik fazda (C ve D sınıfları) olanlarında anamnez temelinde öncelikli olarak egzersiz intoleransı, kronik öksürük ve kilo kaybı not edilmişken, fiziksel muayene bulgularında değişen derecelerde mitral kapak punkta maksimasında sistolik üfürümler (3-6/6 derece), abdominal genişleme (ascites) ve jugular dolgunluk tespit edilmiştir. Üfürümün şiddeti ile uyumlu olarak (>4/6 derece) hastalarda prekordiyal vibrasyon (thrill) da belirlenmiştir. Çalışmanın kontrol ve test gruplarını oluşturan köpeklere ait klinik parametrelerin ortalama ve standart hata değerleri ile minimum ve maksimum verileri Tablo 9’da belirtilmiştir. Buna göre kontrol ve test grubundaki köpeklerin yaş ve canlı ağırlıklarının minimum ve maksimum değerleri arasında farklılıklar olsa da ortalamalarında istatistiksel bir değişim gözlenmemiştir. Yaş ortalamaları kontrol grubu için $3,5 \pm 0,9$ yıl, test grubunda B2 sınıfı için $6,0 \pm 4,1$, C sınıfı için $8,6 \pm 5,4$ ve D sınıfı için de $9,1 \pm 5,1$ yıl olarak belirlenmiş, kalp hastalığı şiddeti yükseldikçe ortalama yaş değerinin de arttığı dikkat çekmiştir. Kalp ve solunum sayıları kontrol grubu (A sınıfı) ile karşılaştırıldığında test grubunu oluşturan kalp yetmezliği gruplarında (B2, C ve D sınıfları) kademeli bir artış göstermiştir. Kalp frekansında D sınıfı hastalarda kontrole ($P < 0,001$) ve B sınıfı hastalara göre ($P < 0,01$); solunum sayısında da test grubunun tamamında kontrole göre önemli artış ($P < 0,01 - 0,001$) belirlenmiştir. SAP değeri açısından C sınıfı hastalarda kontrole ($P < 0,05$) ve B2 sınıfı hastalara göre ($P < 0,01$) yüksek değerler elde edilmiştir. D sınıfı hastalarda SAP değeri A ve B2 sınıflarındaki değerlerden yüksek olsa da standart hatanın genişliğinden dolayı istatistiksel önem oluşmamıştır. SAP için C ve D sınıflarında maksimum değerlerin sırasıyla 206 mmHg ve 162 mmHg belirlenmesi dikkate değer görülmüştür. Benzer şekilde MAP değeri C sınıfı hastalarda A ve B2 sınıflarına göre daha yüksek tespit edilmiş ($P < 0,05$), ancak DAP verilerinde gruplar arası istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir.

Tedavi ile birlikte bazı klinik bulgularda (SAP, DAP ve MAP) anlamlı değişimler izlenirken ($P < 0,05$), diğerlerinde istatistiksel düzeyde bir değişim belirlenmemiştir (Tablo 10).

Tablo 9: Kontrol ve test grubu köpeklerde klinik parametrelerin ortalama ve minimum-maksimum değerleri

Parametre	A Sınıfı (Kontrol) (n = 8)	B2 Sınıfı (n = 6)	C Sınıfı (n = 10)	D Sınıfı (n = 5)
Yaş	3,5 ± 0,3 ^a (2-5)	6,0 ± 1,6 ^{ab} (1-10)	8,6 ± 1,6 ^{b*} (1-17)	9,1 ± 1,8 ^{b**} (1-15)
Vücut Ağırlığı kg	23,5 ± 3,8 ^a (7-40)	19,1 ± 4,7 ^a (7-34)	16,0 ± 5,6 ^a (4-60)	34,1 ± 8,5 ^a (9-70)
Cinsiyet Erkek / Dişi	2/6	2/4	6/4	3/2
P /dk	119 ± 31 ^a (100-196)	128 ± 23 ^{ab} (90-160)	156 ± 18 ^{abc} (120-182)	191 ± 72 ^{c***#**} (102-326)
R /dk	36 ± 14 ^a (20-60)	59 ± 6 ^{b***} (48-68)	68 ± 14 ^{b***} (52-100)	63 ± 19 ^{b**} (32-100)
T °C	38,3 ± 0,2 ^a (38,0-38,8)	38,1 ± 0,1 ^a (38,0-38,4)	38,3 ± 0,4 ^a (38,0-39,5)	38,2 ± 0,3 ^a (37,8-38,6)
SAP mmHg	135 ± 16 ^a (120-170)	130 ± 7 ^a (123-139)	154 ± 19 ^{b*##**} (134-206)	145 ± 19 ^{ab} (112-162)
DAP mm Hg	73 ± 6 ^a (68-85)	64 ± 7 ^a (58-76)	77 ± 10 ^a (66-100)	74 ± 10 ^a (62-84)
MAP mm Hg	104 ± 10 ^a (95-125)	97 ± 5 ^a (91-103)	115 ± 14 ^{b*} (102-153)	109 ± 9 ^{ab} (97-123)

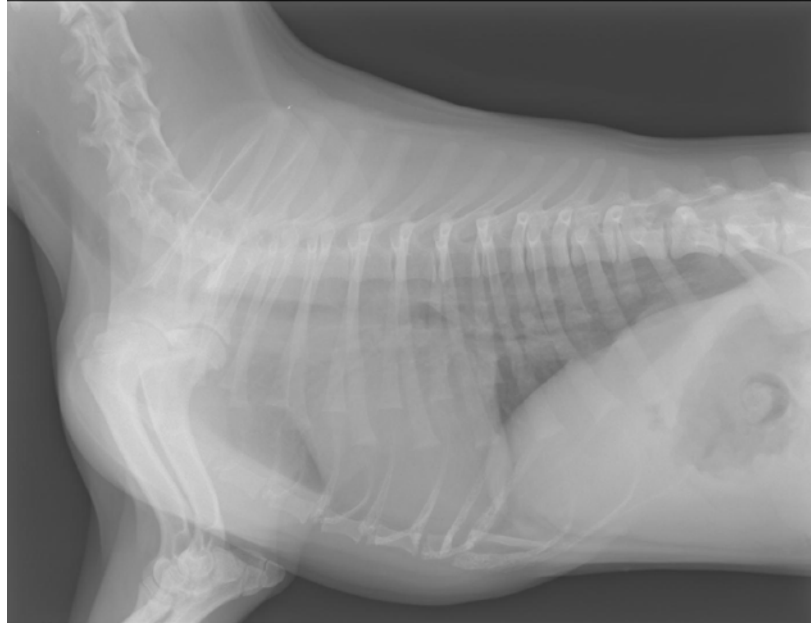
Aynı satırda aynı harfi taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık yoktur.

B grubu ile karşılaştırıldığında * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001

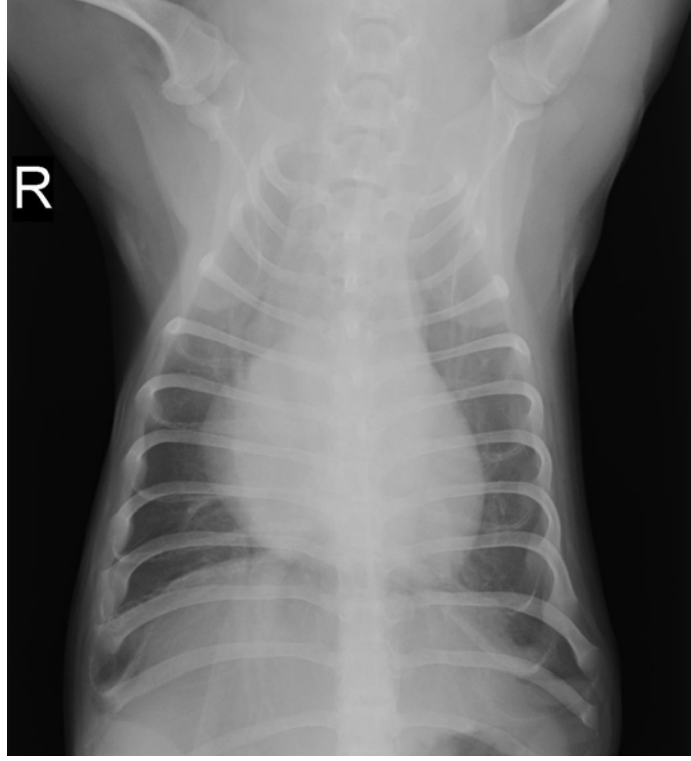
Tablo 10: C sınıfı köpeklerde klinik parametrelerin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri (minimum-maksimum)

Parametre	Tedavi Öncesi (n = 10)	Tedavi Sonrası (n = 6)	P değeri
Vücut Ağırlığı kg	16,0 ± 18,5 (4-60)	15,8 ± 16,3 (4-52)	0,973
P /dk	156 ± 18 (120-182)	142 ± 17 (116-160)	0,110
R/dk	68 ± 14 (52-100)	58 ± 9 (44-72)	0,106
T °C	38,3 ± 0,4 (38,39,5)	38,1 ± 0,3 (37,8-38,7)	0,444
SAP mm Hg	154 ± 19 (134-206)	137 ± 7 (128-150)	< 0,05
DAP mm Hg	77 ± 10 (66-100)	67 ± 6 (60-76)	< 0,05
MAP mm Hg	115 ± 14 (102-153)	102 ± 6 (94-110)	< 0,05

4.2. Radyolojik Bulgular: Çalışmaya katılan köpekler radyolojik olarak incelendiğinde; test grubunda B2 sınıfı hastaların tamamında lateral pozisyonda kalbin kapladığı interkostal alanın ($>3,5$ interkostal boşluk) ve VHS'nin arttığı ($>11,0$), C ve D sınıfında ise mevcut bulguların daha belirgin ve şiddetli olduğu belirlenmiştir. Semptomatik gruptaki köpeklerde kardiyomegali ile birlikte pulmoner ve perihilar ödem, vena cava caudalisin dilatasyonu ve yukarı deviasyonu, tracheanın dorsale deviasyonu, ventriküler sternal temas artışı ve pulmoner ven ve arterde dolgunluk bulguları ortak tespitler olmuştur. Bazı hastalarda (2 adet C sınıfı, 3 adet D sınıftan) radyolojik olarak pleural ve peritoneal serbest sıvı (asites) varlığı da ortaya konmuş, bu tespitler ilerleyen muayene şeması içinde ultrasonografik olarak da konfirme edilmiştir.

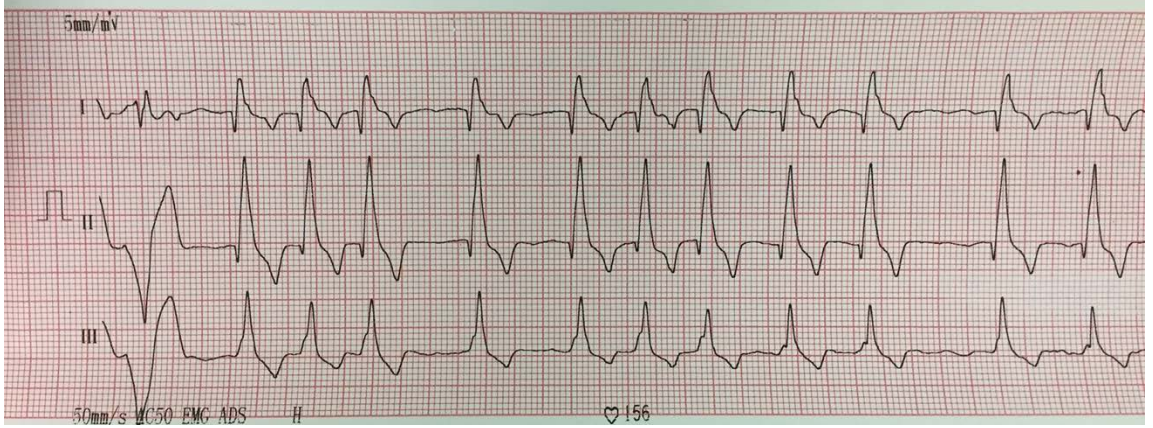


Şekil 16: C sınıfı hastanın laterolateral radyografisi (Shihtzu, 1,5 yaş, dişi, 4kg); kardiyomegali, trekhea ve kaudal vena kavanın dorsole deviyasyonu, pulmonar damar konjesyonu ve minimal interstitiel alveolar desen



Şekil 17: C sınıfı hastanın ventrodorsal radyografisi (Shihtzu, 1,5 yaş, dişi, 4kg); kardiyomegali, sol kardiyo-toraksik oranda azalma (sol ventriküler büyüme), minimal interstitiel akciğer deseni ve pulmoner damarlarda konjesyon.

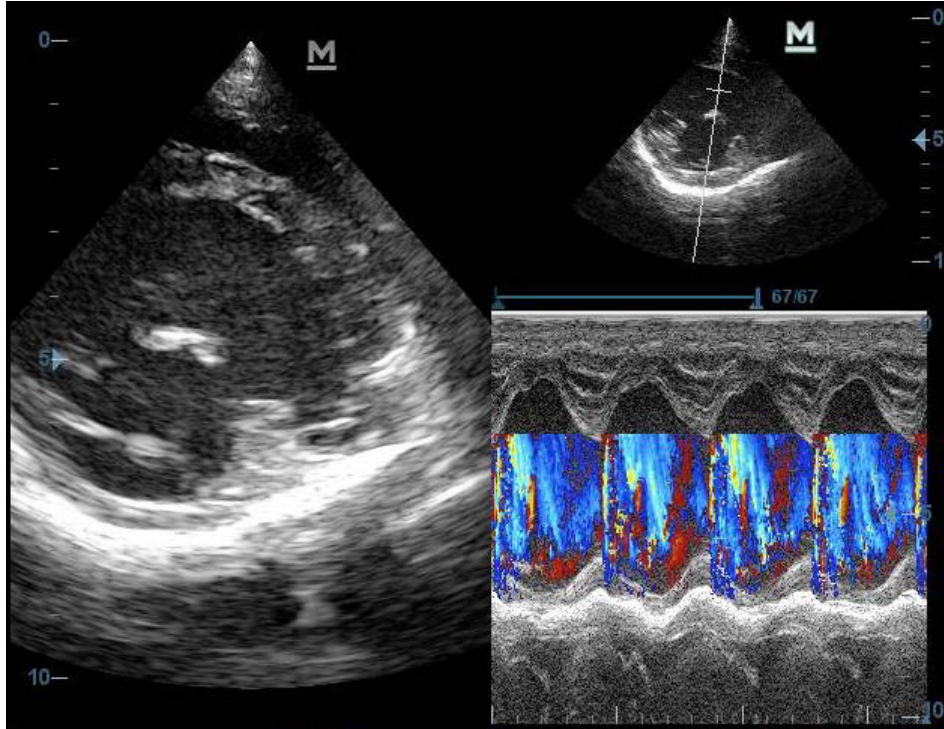
4.3. EKG bulguları: Hastaların EKG incelenmesi sırasında ritim analizleri yapılmış; kontrol (A sınıfı) ve asemptomatik test grubunda (B2 sınıfı) bulunan köpeklerin tümünde sinus ritim (n=14) tespit edilmiştir. Bu olguların bazılarında (6/14) respiratorik sinus aritmi belirlenmiştir. Semptomatik test sınıflarında (C ve D); sinus taşiaritmi (4/15) ve atriyal fibrilasyon (3/15) ile birlikte atriyal ve ventriküler prematür kompleksler (4/15) belirlenmiştir. Ritim değerlendirmesine ek olarak morfolojik değerlendirmeler de yapılmış; sol atriyal dilatasyon (P-mitrale, 2/15), sağ atriyal dilatasyon (P-pulmonale, 3/15), sol ventriküler büyüme (5/15), küçük kompleks QRS oluşumu (2/15), sağ veya sol aksis deviasyonu (8/15) bulgularına ulaşılmıştır.



Şekil 18: D sınıfı bir hastanın EKG görüntüsü (5mm/mV - 50 mm/s); atriyal fibrilasyon ve ventriküler ekstra sistol (Kangal, 6 yaş, erkek, 50 kg)

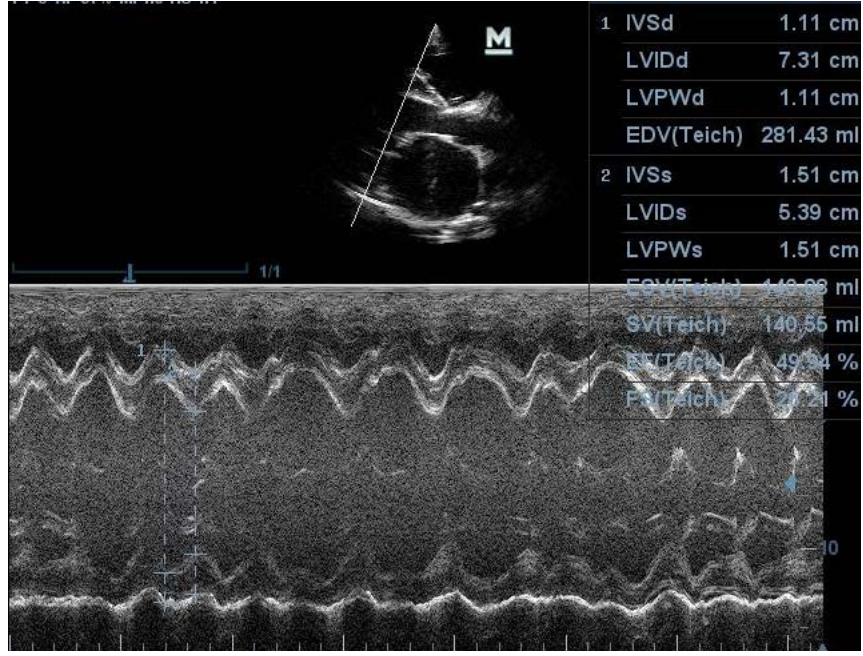
4.4. Ekokardiyografik Bulgular: Tanısal süreçte ekokardiyografi tekniğine uygun olarak gerçekleştirilmiş; sağ parasternal uzun eksen M-mode ölçümleri ile sol ventrikül ilişkili fonksiyonel ve geometrik değerlendirmeler yapılmıştır (Tablo 11). Bu değerlendirme ile birbirini takip edecek şekilde diyastol ve sistolde sağ ventrikül (RVDD), interventriküler septum (IVSDd ve IVSDs), sol ventrikül (LVDD ve LVDs) ile sol ventrikül serbest duvar (LVPWDD ve LVPWDS) çapları belirlenmiştir. RVDD değeri A sınıfından başlayarak ($0,62 \pm 0,26$ cm) D sınıfına ($1,36 \pm 0,78$ cm) kadar ortalama olarak artış gösterse de istatistiksel bir fark oluşmamıştır. LVDD ve LVDs çapları D sınıfı hastalarda kontrol (A sınıfı; $P < 0,001$) ve diğer gruplara göre önemli artış göstermiştir ($P < 0,01$). C sınıfı hastalarda LVPWDD ve LVPWDS değerleri diğer gruplara göre önemli düzeyde düşük çıkmıştır ($P < 0,01 - 0,001$). IVSDd ve IVSDs çapları ile FS ve EF değerlerinde gruplar arasında istatistiksel önem oluşmamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EPSS değeri test grubunda anlamlı değişkenlik göstermemiş, ancak D sınıfı hastalarda rakamsal yükseklik dikkat çekmiştir (Tablo 11).

Sağ parasternal kısa eksen Ao düzey ölçümleri ile C ve D sınıfı kalp yetmezliklerinde LA ve MPA çaplarında A ve B2 sınıflarına göre artış ($P < 0,01$) belirlenmiştir (Tablo 12).

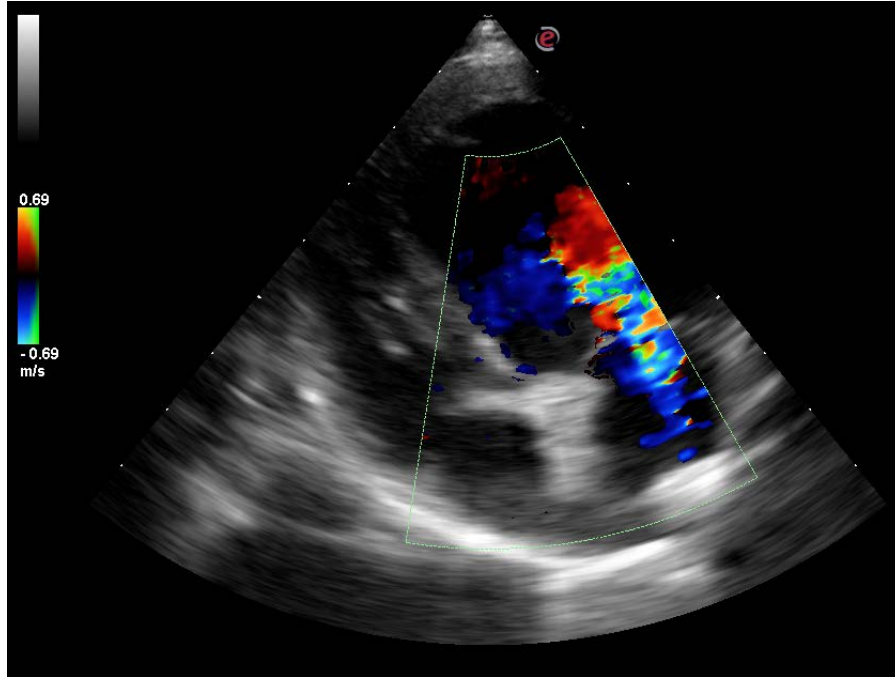


Şekil 19: C sınıfı hastada 2-D ve renkli M-mode ile sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyinden mitral regürjitasyon örneği (Cavalier King Charles, 5 yaş, dişi, 11,5 kg).

Doppler ölçümlerinde Ao ve MPA maksimum velositeleri ile Ao ejeksiyon süresi gruplar arasında önemli istatistiksel farklılık ortaya çıkmamıştır. MV ve TV E/A oranları D sınıfında ($3,0 \pm 1,3$ ve $2,3 \pm 0,6$, sırasıyla) kontrol ($1,9 \pm 0,6$ ve $1,6 \pm 0,4$) ve diğer kalp yetmezliği sınıflarına göre yükseliş göstermiş; ancak, istatistiksel farklılık ortaya konulamamıştır (Tablo 13).



Şekil 20: C sınıfı bir hastada dilate kardiyomyopati (Kangal, 1,5 yaş, erkek, 45 kg); LV diyastol çapında artma, FS değerinde düşme, EPSS'de artma ve hiperkinetik interventriküler septum (LV basınç artışı yansıtmakta).



Şekil 21: Apikal 4 boşluk pozisyonunda mitral regürjitasyon (Pekingese, 14yaş, dişi, 6kg).

Tablo 11: Kontrol ve test grubu köpeklerde ekokardiyografik ölçümlerin ortalama değerleri ve standart hataları (sağ parasternal uzun eksen 4 boşluk M-mode ölçümleri)

Parametre	A sınıfı (Kontrol) (n = 8)	B2 Sınıfı (n = 6)	C Sınıfı (n = 10)	D Sınıfı (n = 5)
RVDd (cm)	0,62 ± 0,09a	0,96 ± 0,11a	0,97 ± 0,33a	1,36 ± 0,35a
IVSd (cm)	0,90 ± 0,10a	1,1 ± 0,10a	0,70 ± 0,04a	1,05 ± 0,11a
LVd (cm)	3,24 ± 0,22a	3,01 ± 0,51a	3,98 ± 0,44a	5,72 ± 2,05b#**
PWd (cm)	1,04 ± 0,11a	0,91 ± 0,14a	0,61 ± 0,03b**	0,93 ± 0,04a
IVSs (cm)	1,1 ± 0,12a	1,3 ± 0,13a	0,90 ± 0,02a	1,24 ± 0,12a
LVS (cm)	2,21 ± 0,24a	2,15 ± 0,13a	2,87 ± 0,45a	4,36 ± 0,84b***
PWs (cm)	1,25 ± 0,10a	1,21 ± 0,15a	0,74 ± 0,01b***	1,31 ± 0,10a
EPSS (cm)	0,28 ± 0,14a	0,42 ± 0,08a	0,55 ± 0,16a	1,24 ± 0,32a
FS %	32,2 ± 2,0a	35,0 ± 2,2a	29,5 ± 2,0a	26,7 ± 5,5a
EF %	59,5 ± 3,8a	65,1 ± 2,2a	55,9 ± 3,8a	49,8 ± 4,2a

Aynı satırda aynı harfi taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık yoktur.

C grubu ile karşılaştırıldığında

* P <0.05 ** P <0.01

Tablo 12: Kontrol ve test grubu köpeklerde ekokardiyografik ölçümlerin ortalama değerleri ve standart hataları (sağ parasternal kısa eksen aort düzeyi ölçümleri)

Parametre (cm)	A sınıfı (Kontrol) (n = 8)	B2 Sınıfı (n = 6)	C Sınıfı (n = 10)	D Sınıfı (n = 5)
LA (cm)	2,2 ± 0,5a	2,3 ± 0,9a	3,1 ± 1,2ab	4,7 ± 1,5b**
Ao (cm)	2,0 ± 0,5a	1,9 ± 0,5a	1,4 ± 0,4a	1,9 ± 0,5a
MPA (cm)	1,7 ± 0,4ab	1,6 ± 0,5a	1,5 ± 0,5a	2,2 ± 0,5b*
LA/Ao	1,1 ± 0,0a	1,6 ± 0,1a	2,2 ± 0,1b***	2,3 ± 0,1b***

Aynı satırda aynı harfi taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık yoktur.

* P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001

Tablo 13: Kontrol ve test grubu köpeklerde ekokardiyografik ölçümlerin ortalama değerleri ve standart hataları

Parametre (cm)	A sınıfı (Kontrol) (n = 8)	B2 Sınıfı (n = 6)	C Sınıfı (n = 10)	D Sınıfı (n = 5)
PA Vmax mmHg	0,8 ± 0,1a	1,0 ± 0,3a	0,6 ± 0,1a	0,6 ± 0,2a
Ao Vmax mmHg	0,9 ± 0,2a	1,4 ± 0,3a	1,0 ± 0,5a	1,0 ± 0,3a
Ao ET m/s	195 ± 25a	231 ± 25a	194 ± 38a	181 ± 38a
MV E/A	1,9 ± 0,2a	2,2 ± 0,2a	2,2 ± 0,1a	3,0 ± 0,5a
TV E/A	1,6 ± 0,4a	1,8 ± 0,5a	2,0 ± 0,5a	2,3 ± 0,6a

4.5. Laboratuvar Bulguları

4.5.1. Hematoloji: Lökogram verileri incelendiğinde total lökosit (WBC) değerinde, kontrol ve asemptomatik grup (B2 sınıfı) ile semptomatik gruplar arasında istatistiksel farklılık belirlenmiştir. WBC ve nötrofil değerleri C ve D sınıflarında A ve B sınıflarına göre $P < 0,001$ düzeyinde yüksek bulunmuştur. Eritrogram değerleri incelendiğinde hematokrit yüzdesinin D sınıfı hastalarda A ve B2 sınıflarına göre azaldığı ($P < 0,001$), C sınıfına göre ise önemli bir değişim göstermediği tespit edilmiştir. Eritrogramın diğer tüm parametreleri ve trombogram değerlerinde gruplar arasında istatistiksel farklılık oluşmamıştır (Tablo 14). Tedavi öncesi ve sonrası hemogram verilerinde istatistiksel farklılık gözlemlenmemiştir. (Tablo 15).

Tablo 14: Kontrol ve test grubu köpeklerde rutin hemogram parametrelerinin ortalama ve minimum-maksimum değerleri (minimum-maksimum)

Parametre	A sınıfı (Kontrol) (n = 8)	B2 Sınıfı (n = 6)	C Sınıfı (n = 10)	D Sınıfı (n = 5)
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	11,5 \pm 1,1a (8,9-18,5)	10,1 \pm 1,4a (7,6-15,7)	18,4 \pm 2,5b#** (9,6-34,5)	18,7 \pm 1,5b#** (19,7-10,9)
Nötrofil ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7,9 \pm 0,8a (6,1-12,9)	7,3 \pm 0,9a (5,6-11,2)	14,4 \pm 2,2b** (6,6-30,1)	15,7 \pm 1,3b** (8,3-19,7)
Lenfosit ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	2,4 \pm 1a (1,1-4,2)	2 \pm 0,7a (1,2-3,1)	2,5 \pm 1,4a (1,1-6,2)	1,8 \pm 0,7a (0,5-3,1)
Monosit ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,5 \pm 0,2a (0,2-0,8)	0,4 \pm 0,1a (0,2-0,5)	0,7 \pm 0,4a (0,2-1,4)	1 \pm 0,6a (0,1-2,1)
Eosinofil ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,4 \pm 0,2a (0,1-0,8)	0,4 \pm 0,3ab (0,07-0,9)	0,5 \pm 0,6ab (0,02-2,1)	0,1 \pm 0,0b* (0,02-0,2)
Basofil ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,1 \pm 0,0a (0,02-0,2)	0,1 \pm 0,0a (0,02-0,24)	0,1 \pm 0,0a (0,01-0,3)	0,0 \pm 0,0a (0-0,2)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	6,5 \pm 0,4a (6,02-7,07)	7,1 \pm 0,3a (6,4-7,6)	6,25 \pm 1,1a (4,2-8,2)	5,8 \pm 1,1a (4,4-7,5)
HGB gr/dL	14,8 \pm 1,09 (13,7-16,2)	16,2 \pm 1,4 (14-17,9)	14,7 \pm 2,6 (10,8-19,6)	13 \pm 2,8 (9,8-17,6)
Hematokrit %	43,8 \pm 3,2ab (39,8-48,9)	48,8 \pm 5,3a (40,7-55,4)	43,6 \pm 9,2ab (28,7-61,2)	37,6 \pm 7b*** (30,3-50,4)
MCV fL	67,3 \pm 2,6a (62-70)	68,5 \pm 4,7a (62-73)	69,5 \pm 4,2a (61-75)	64,3 \pm 4a (58-68)
MCH gr/dL	22,8 \pm 0,9a (21,8-24,4)	22,7 \pm 1,2a (21,5-24,9)	23,6 \pm 2,4a (20,1-29)	22,5 \pm 4,5a (17,3-32,1)
MCHC gr/dL	33,9 \pm 1,2a (31,9-35,1)	33,2 \pm 1,5a (31,1-34,7)	34 \pm 2,6a (29,2-38,4)	34,8 \pm 5,5a (29-47,2)
RDW %	17,2 \pm 1,3a (15,5-20,1)	18,2 \pm 2,5a (16,2-21,9)	17,5 \pm 2,2a (15,6-23,9)	17,5 \pm 2,4a (15,4-21,9)
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	271 \pm 105a (66-391)	435 \pm 234a (259-780)	385 \pm 185a (136-829)	340 \pm 195a (155-769)
PCT %	0,27 \pm 0,12a (0,03-0,42)	0,48 \pm 0,21a (0,22-0,75)	0,35 \pm 0,13a (0,15-0,62)	0,28 \pm 0,13a (0,11-0,50)
MPV fL	9,6 \pm 2,3a (5,3-12,7)	8,0 \pm 1,5a (6,2-10,3)	9,4 \pm 1,2a (7,5-11,8)	8,7 \pm 1,8a (6,5-11,1)
PDW %	37,5 \pm 6,5a (23-44,3)	33,7 \pm 6,4a (23,9-38,8)	37,7 \pm 5,6a (23-44,2)	30,8 \pm 10,0a (15-39,6)

Aynı satırda aynı harfi taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık yoktur.

B grubu ile karşılaştırıldığında * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Tablo 15: C sınıfı köpeklerde rutin hemogram parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri (minimum-maksimum)

Parametre	Tedavi Öncesi (n = 10)	Tedavi Sonrası (n = 6*)	P değeri
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	18,4 \pm 8,4 (9,6-34,5)	16,2 \pm 6,9 (9,9-30,6)	0,587
Nötrofil ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	14,4 \pm 7,4 (6,6-30,1)	12,6 \pm 6 (7,4-25)	0,526
Lenfosit ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	2,5 \pm 1,4 (1,1-6,2)	2,4 \pm 1,1 (1-4,1)	1
Monosit ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,78 \pm 0,41 (0,2-1,4)	0,99 \pm 0,35 (0,43-1,29)	0,295
Eosinofil ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,5 \pm 0,6 (0,02-2,1)	0,13 \pm 0,09 (0,02-0,29)	< 0,05
Basofil ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,13 \pm 0,09 (0,01-0,3)	0,06 \pm 0,05 (0-0,14)	0,079
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	6,25 \pm 1,1 (4,2-8,2)	6,36 \pm 1,08 (5,05-7,74)	0,839
HGB gr/dL	14,7 \pm 2,6 (10,8-19,6)	15,4 \pm 1,6 (14,1-18,9)	0,521
Hematokrit %	43,6 \pm 9,2 (28,7-61,2)	42,6 \pm 6,5 (34,7-55,1)	0,824
MCV fL	69,5 \pm 4,2 (61-75)	68,5 \pm 3,7 (63-75)	0,630
MCH gr/dL	23,6 \pm 2,4 (20,1-29,0)	25,0 \pm 4,0 (21,0-32,1)	0,367
MCHC gr/dL	34 \pm 2,6 (29,2-38,4)	35,8 \pm 6,1 (27,0-47,2)	0,397
RDW %	17,5 \pm 2,2 (15,6-23,9)	16,6 \pm 0,8 (15,6-18,1)	0,388
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	385 \pm 185 (136-829)	379 \pm 116 (263-571)	0,856
PCT %	0,35 \pm 0,13 (0,15-0,62)	0,34 \pm 0,08 (0,25-0,51)	0,980
MPV fL	9,4 \pm 1,2 (7,5-11,8)	9,0 \pm 1,2 (7,3-11,1)	0,500
PDW %	37,7 \pm 5,6 (23-44,2)	36,8 \pm 2,6 (32,7-39,8)	0,341

* tedavi sonrası bazı olguların (n=4) takibi yapılamamıştır.

4.5.2. Serum Biyokimyasal Bulgular: Serum kardiyak troponin (cTnI), total tiroksin (T4) ve rutin serum biyokimyasal değerler irdelenmiştir (Tablo 16). Serum cTnI değeri semptomatik hastalarda (C sınıfı: 1,80 \pm 1,39 ng/mL ve D sınıfında: 7,09 \pm 12,24 ng/mL) kontrol grubu (A sınıfı; 0,03 \pm 0,04 ng/mL) ve B2 sınıfına göre (0,03 \pm 0,04 ng/mL) önemli düzeyde artış gözlemlenmiştir. Tiroid panelinde serum T4 ve kolesterol seviyeleri incelenmiştir: Kontrol grubu ve test grupları arasında istatistiksel önemde farklılık belirlenmemiştir. Serum T4 değeri kontrol grubunda 2,6 \pm 1,1 ug/dL, B2 sınıfında 1,8 \pm 0,8 ug/dL, C sınıfında 2,0 \pm 0,9 ug/dL ve D sınıfı

hastalarda ise $1,1 \pm 0,5$ ug/dL ($P < 0,001$) olarak ölçülmüş; ancak, ortalama değerlerin referans aralığında kaldığı görülmüştür. Maksimum serum kolesterol değerlerinin tüm gruplarda birbirine yakın olduğu (317-340 mg/dL aralığında) tespit edilmiştir.

Tablo 16: Kontrol ve test grubu köpeklerde serum biyokimyasal parametrelerinin ortalama ve minimum-maksimum değerleri

Parametre	A sınıfı (Kontrol) (n = 8)	B2 Sınıfı (n = 6)	C Sınıfı (n = 10)	D Sınıfı (n = 5)
ALB (g/dL)	3,7 ± 0,3a (3,3-4,4)	3,6 ± 0,25a (3,3-4)	3,4 ± 0,6a (2,3-4,2)	2,9 ± 0,8a (2-4,1)
ALP (U/L)	35,2 ± 22,5a (17-83)	62,1 ± 46a (26-152)	86,3 ± 57,4a (9-179)	448 ± 726a (12-2100)
ALT (g/dL)	32,4 ± 7,3a (24-43)	45 ± 22,6a (23-86)	98,7 ± 77,2b* (35-305)	441 ± 1083ab (20-3120)
AMY (U/L)	656 ± 147a (422-829)	552 ± 166a (341-828)	619 ± 327a (310-1280)	681 ± 256a (435-1189)
TBIL (mg/dL)	0,24 ± 0,07a (0,2-0,4)	0,33 ± 0,13a (0,2-0,6)	0,31 ± 0,06a (0,2-0,4)	0,3 ± 0,07a (0,2-0,4)
BUN (mg/dL)	14,1 ± 4,3a (8-21)	15,1 ± 6,1a (7-26)	22,3 ± 15,5a (7-52)	34,5 ± 24,2a (12-89)
CA (mg/dL)	10,2 ± 0,4a (9,7-10,9)	10,4 ± 0,4a (9,8-11)	10,6 ± 0,6ab*** (9,9-12)	9,6 ± 0,4ac (9-10,3)
PHOS (mg/dL)	4,6 ± 0,5a (3,9-5,2)	4,2 ± 0,8a (2,8-5,3)	5,9 ± 1,7a (4-8,7)	5,1 ± 0,6a (3,9-6)
CREA (mg/dL)	0,8 ± 0,2a (0,4-1,2)	0,8 ± 0,07a (0,8-1)	0,91 ± 0,3a (0,6-1,8)	1 ± 0,25a (0,8-1,4)
GLU (mg/dL)	79,1 ± 18,3a (60-117)	84,6 ± 21,7ab (55-103)	117,6 ± 41,7ab (72-210)	116,1 ± 27,5b* (73-164)
NA (nmol/L)	137,5 ± 4,1a (129-142)	142,5 ± 2a (140-146)	141,9 ± 6,1a (131-151)	136,8 ± 8a (120-143)
K (nmol/L)	4,9 ± 0,4a (4,1-5,5)	5,5 ± 0,3a (5-6)	5,5 ± 1,1a (4,1-8,5)	4,7 ± 1,1a (3-6,2)
TP (g/dL)	6,4 ± 0,2a (6,1-6,9)	6,4 ± 0,2a (6,1-6,8)	6,4 ± 0,8a (4,7-7,9)	5,8 ± 0,9a (4,4-7,1)
GLOB (g/dL)	2,8 ± 0,4a (2,3-3,4)	2,7 ± 0,3a (2,3-3,2)	3 ± 0,9a (1,5-4,3)	2,6 ± 0,6a (1,9-3,6)
T4 ug/dL	2,6 ± 1,1a (1,6-3,8)	1,8 ± 0,8ab (1,5-3,1)	2,0 ± 0,9ab (0,5-3,6)	1,1 ± 0,5b*** (0,5-1,8)
CHOL (mg/dL)	242 ± 76a (157-340)	239 ± 40a (200-314)	234 ± 49a (158-326)	198 ± 75a (124-317)
cTnI (ng/mL)	0,03 ± 0,04a (0-0,02)	0,03 ± 0,03a (0,01-0,09)	1,80 ± 1,39b*** (0,14-4,5)	5,30 ± 2,01c*** (0,11-33,8)

Aynı satırda aynı harfi taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık yoktur.

* P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001

Rutin serum biyokimyasal parametreler için kapsamlı profil rotoru kullanılmış ve 14 parametre incelenmiştir. Serum karaciğer enzim değerleri

incelendiğinde, serum ALT düzeyinin C ve D sınıfı hastalarda kontrol ve B2 sınıfına göre istatistiksel düzeyde arttığı ortaya konulmuştur ($P < 0,05$). Böbrek fonksiyonları açısından serum kreatin (Cr) ve kan üre azotu (BUN) değerleri incelenmiş; kontrol ve test grupları arasında önemli istatistiksel farklılık oluşmamıştır. İncelenen diğer parametrelerde albumin, amilaz), total bilirubin (TBIL), kalsiyum (CA), fosfor (PHOS), glukoz (GLU), sodyum (NA), potasyum (K), total protein (TP) ve globulin (GLOB)] kontrol ve test grupları arasında istatistiksel önem olmamakla birlikte değerler köpekler için bildirilen referans aralıklarında yer almıştır (Tablo 16). Adı geçen parametrelerde tedavi öncesi ve sonrası değerlendirmelerde istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 17). Serum T4, Chol ve cTnI değerleri tedavi sonrası ölçüm panelinde yer almamıştır.

Tablo 17: C sınıfı köpeklerde serum biyokimyasal parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri (minimum-maksimum)

Parametre	Tedavi Öncesi (n = 10)	Tedavi Sonrası (n = 6)	P değeri
ALB (g/dL)	3,4 ± 0,6 (2,3-4,2)	3,1 ± 0,8 (2-4,1)	0,401
ALP (U/L)	86 ± 57 (9-179)	87 ± 79 (29-256)	0,856
ALT (g/dL)	98 ± 77 (35-305)	61 ± 34 (23-112)	0,365
AMY (U/L)	619 ± 327 (310-1280)	713 ± 213 (428-931)	0,548
TBIL (mg/dL)	0,31 ± 0,06 (0,2-0,4)	0,41 ± 0,11 (0,3-0,6)	0,061
BUN (mg/dL)	22,3 ± 15,5 (7-52)	30,7 ± 26,0 (7-80)	0,418
CA (mg/dL)	10,6 ± 0,6 (9,9-12)	10,3 ± 0,2 (9,9-10,8)	0,431
PHOS (mg/dL)	5,9 ± 1,7 (4-8,7)	5,4 ± 2,3 (2,2-8,6)	0,655
CREA (mg/dL)	0,91 ± 0,30 (0,6-1,8)	0,84 ± 0,33 (0,4-1,4)	0,699
GLU (mg/dL)	117 ± 41 (72-210)	122 ± 30 (90-184)	0,319
NA (nmol/L)	141 ± 6 (131-151)	138 ± 3 (133-143)	0,181
K (nmol/L)	5,5 ± 1,1 (4,1-8,5)	4,8 ± 0,8 (3-5,5)	0,146
TP (g/dL)	6,4 ± 0,8 (4,7-7,9)	6,0 ± 0,8 (4,6-7,1)	0,344
GLOB (g/dL)	3,0 ± 0,9 (1,5-4,3)	2,7 ± 0,4 (2-3,1)	0,421

Serum vitamin D ve D-dimer düzeylerindeki değişimlere bakıldığında; vitamin D'nin C ve D sınıflarında A ve B2 sınıflarına göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (P < 0,001). D-dimer değerlerinin ortalamalarında rakamsal farklılıklar olsa da standart hata yüksekliklerinden dolayı istatistik önem oluşmamıştır. B2 ve D sınıfı hastalarda maksimum d-dimer düzeylerinin sırasıyla 1000 ng/mL ve 351 ng/mL olması dikkat çekici bulunmuştur (Tablo 18). Tedavi öncesi ve sonrası değerlendirmede her iki parametrede istatistiksel düzeyde bir fark belirlenmemiştir (Tablo 19).

Tablo 18: Kontrol ve test grubu köpeklerde vitamin D ve D-Dimer parametrelerinin ortalama ve minimum-maksimum değerleri

Parametre	A sınıfı (Kontrol) (n = 8)	B2 Sınıfı (n = 6)	C Sınıfı (n = 10)	D Sınıfı (n = 5)
Vitamin D ng/mL	24,1 ± 3,4ab (20,1-28,3)	28,9 ± 6,6ab (21,1-36,7)	17,5 ± 4,0#*** (12,8-23,1)	11,8 ± 4,9c*** (6,19-17,3)
D-Dimer ng/mL	88 ± 38a (50-149)	239 ± 375a (50-1000)	88 ± 70a (50-193)	189 ± 110a (86-351)

Aynı satırda aynı harfi taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık yoktur.

B grubu ile karşılaştırıldığında

*** P <0.001

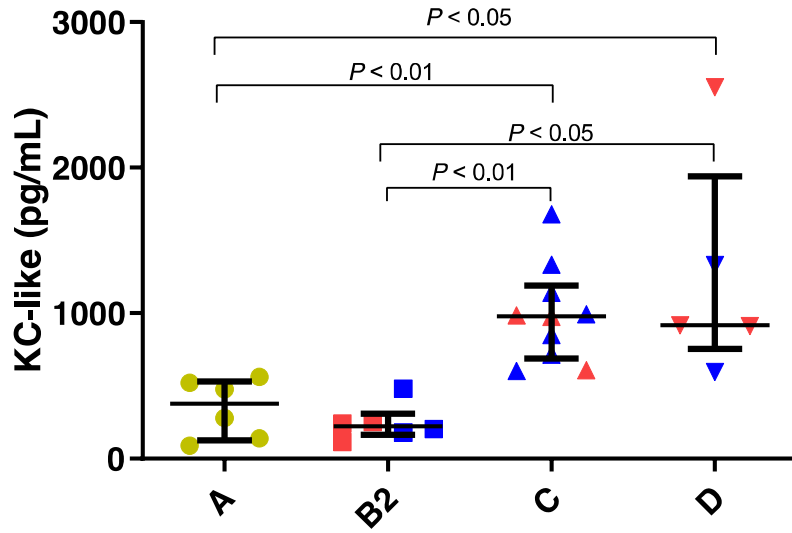
Tablo19: C sınıfı köpeklerde serum biyokimyasal parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri (minimum-maksimum)

Parametre	Tedavi Öncesi (n = 10)	Tedavi Sonrası (n = 6*)	P değeri
Vitamin D ng/mL	17,5 ± 4,0 (12,8-23,1)	17,4 ± 7,6 (7,19-28,8)	0,987
D-Dimer ng/mL	88 ± 70 (50-193)	104 ± 40 (60-157)	0,703

* tedavi sonrası bazı olguların (n=4) takibi yapılamamıştır.

4.5.3. Serum Sitokin Bulguları:

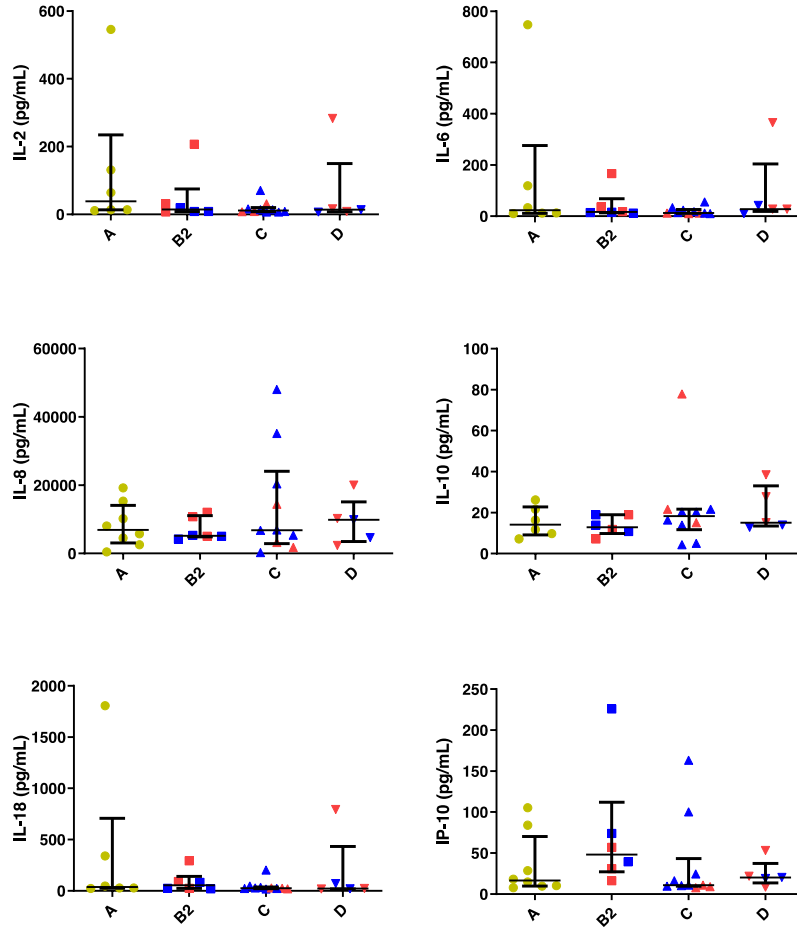
A ve B2 sınıfındaki köpekler C ($P < 0,01$) ve D ($P < 0,05$) sınıfı ile karşılaştırıldığında, KC-like değerinin önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 15). IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, IP-10, MCP-1, GM-CSF, TNF- α ve IFN- γ sitokilerinde ise gruplar arasında herhangi bir istatistiksel farklılık saptanmamıştır (Şekil 16 ve 17).



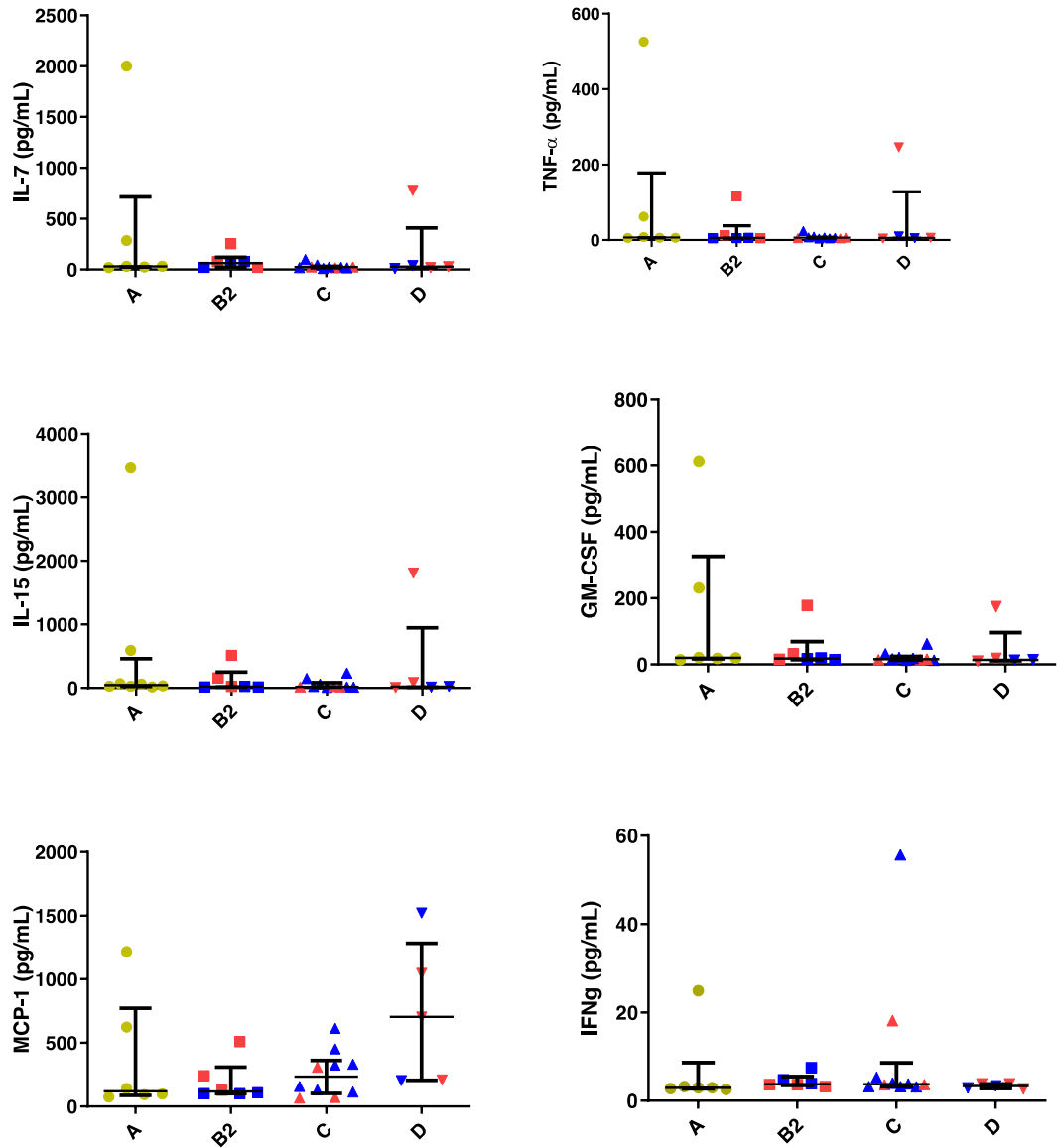
Şekil 22: Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum KC-like düzeylerindeki değişimler (Mavi-MMVD, Kırmızı-DCM'li olguları göstermektedir).

D sınıfı hastalarda CRP konsantrasyonlarının A ve B2 sınıfı hastalara göre daha yüksek olduğu belirlenirken ($P < 0,05$), Hp düzeyinde D sınıfı hastalarda, A sınıfında bulunan köpeklere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır ($P < 0,05$). Negatif akut faz proteini PON1'in serum düzeyi D sınıfı hastalarda, A ve B2

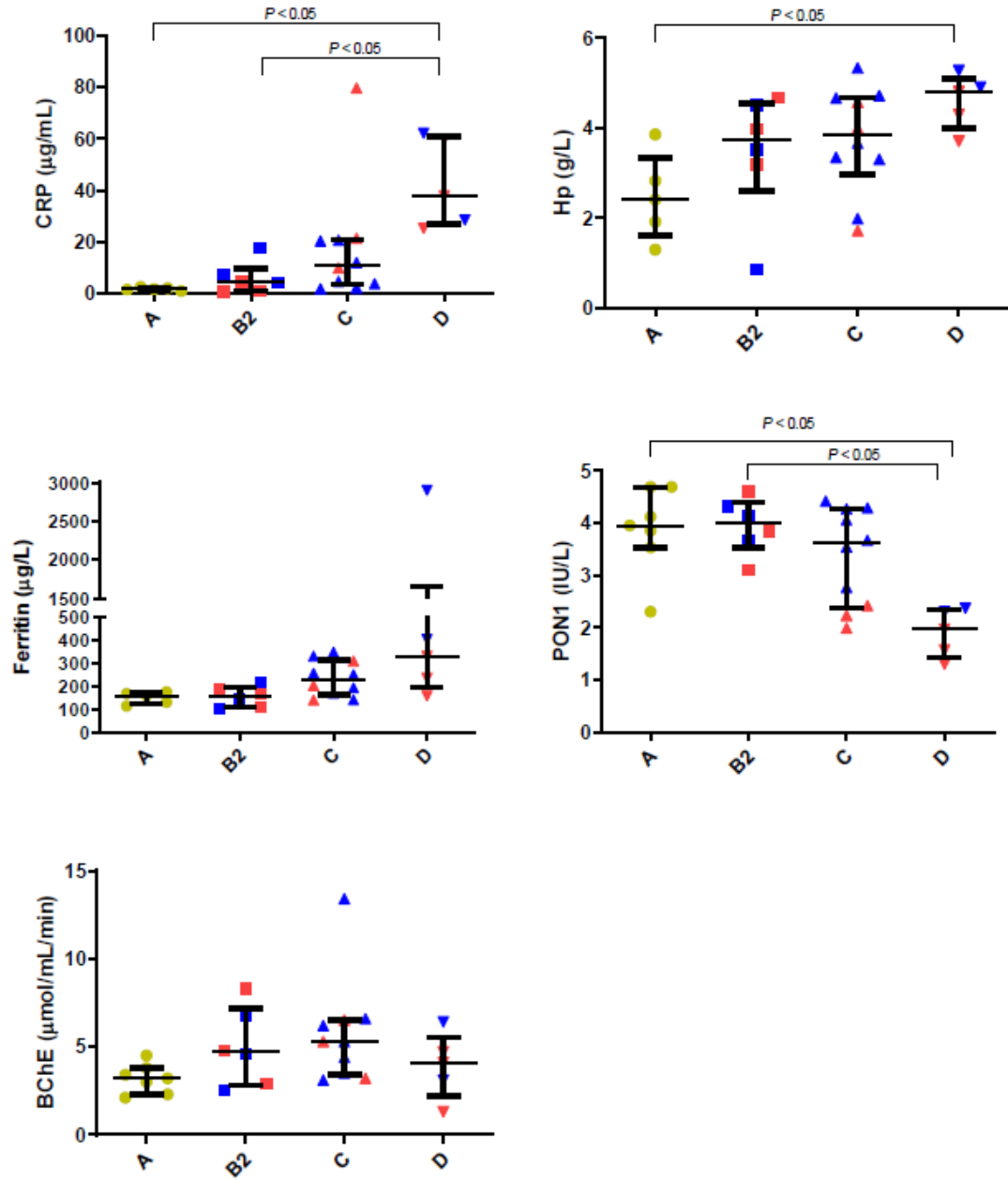
sınıfında bulunanlara göre azalmasına ($P < 0,05$) rağmen bütirikolinesteraz (BChE) düzeyinde gruplar arasında herhangi bir istatistiksel farklılık belirlenmemiştir. Gruplar arasında istatistiksel farklılık belirlenen KC-like ($P < 0,01$), CRP ($P < 0,01$), Hp ($P < 0,01$) ve PON1 ($P < 0,05$) düzeylerinde tedavi sonrası anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir.



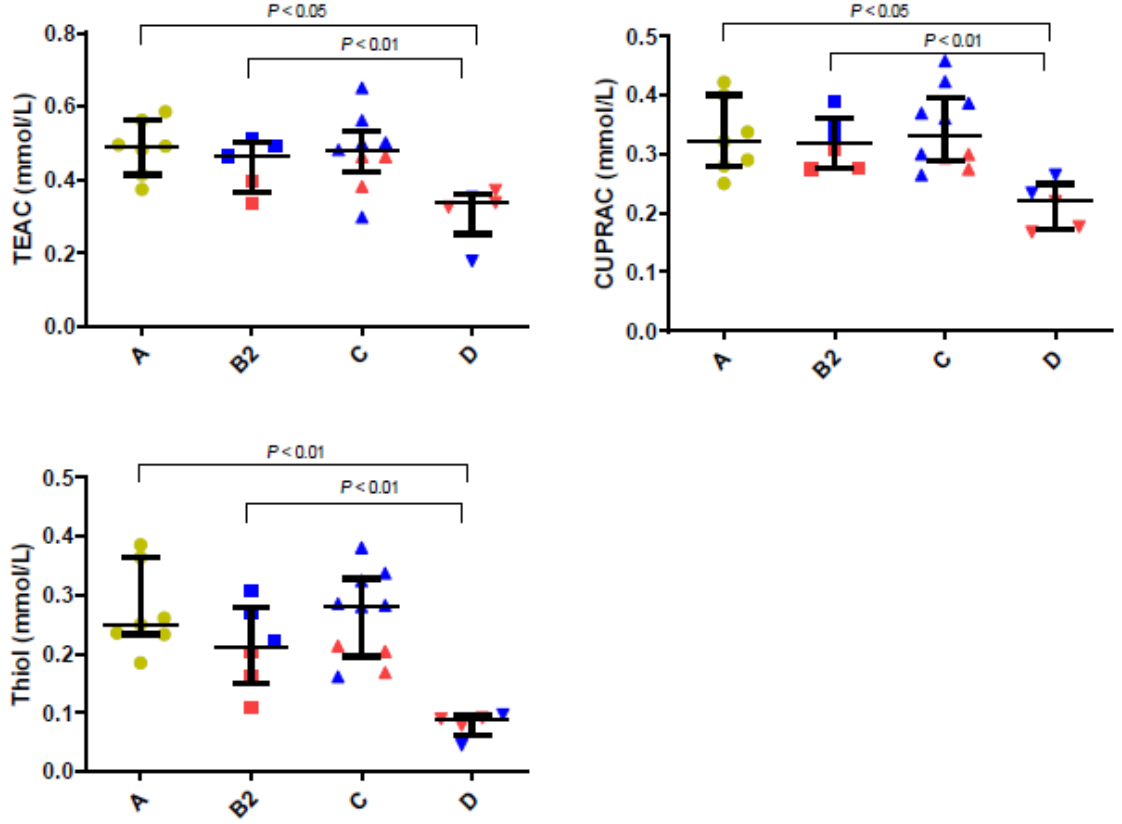
Şekil 23: Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum sitokin değişimleri (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IP-10)(Mavi-MMVD, Kırmızı-DCM'li olguları göstermektedir).



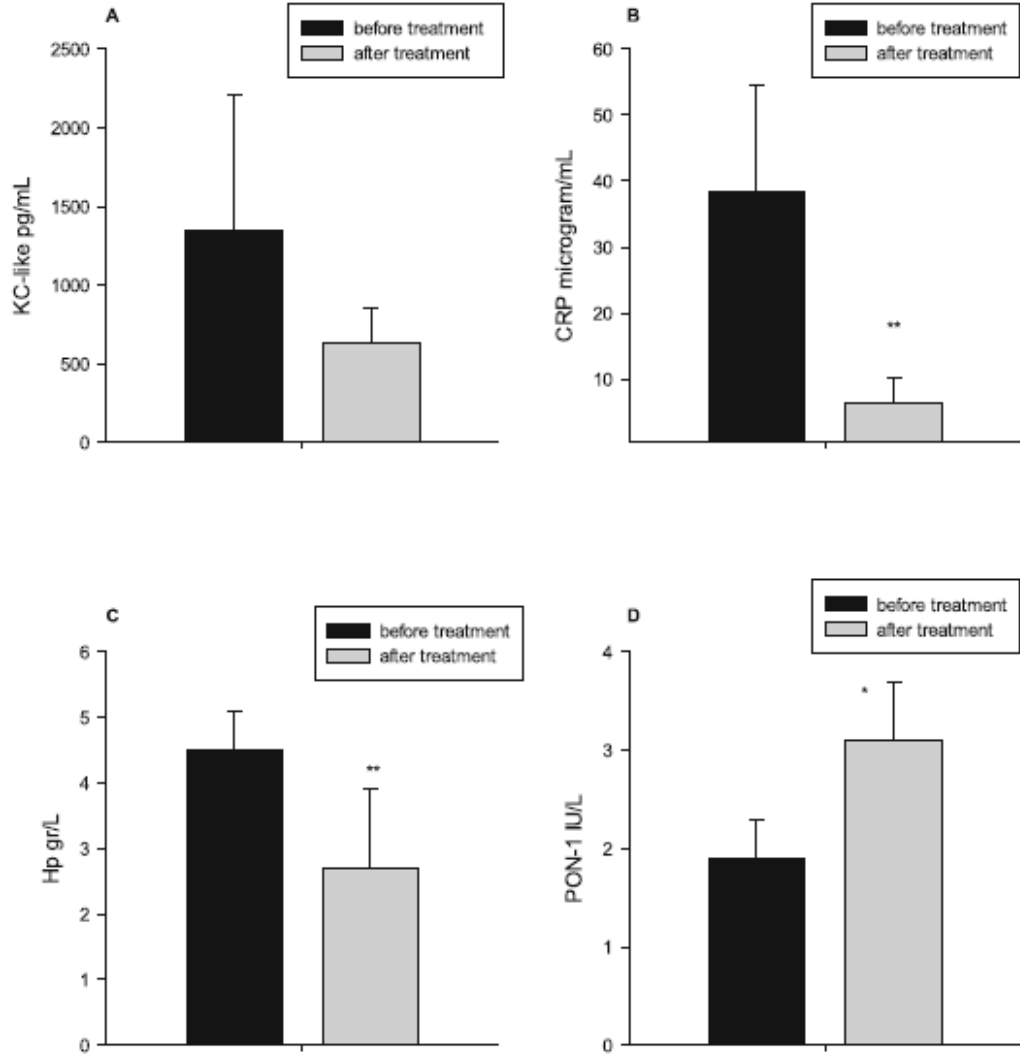
Şekil 24: Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum sitokin değişimleri (IL-7, IL-15, MCP-1, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α). Mavi renk MMVD'li kırmızı ise DCM'li olguları göstermektedir.



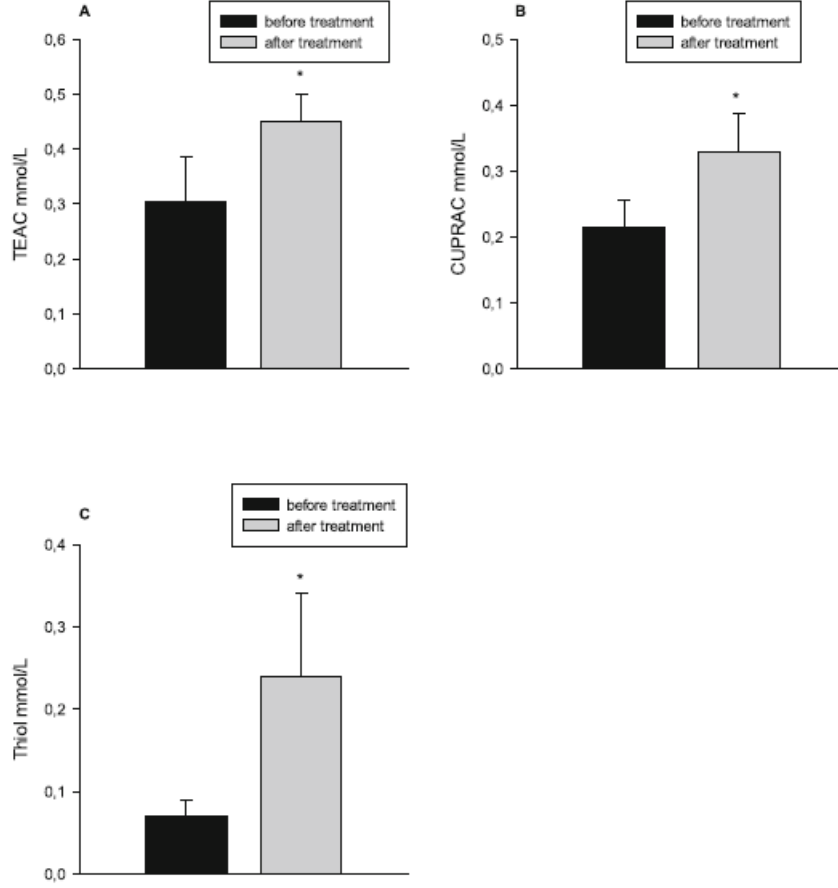
Şekil 25: Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum akut faz proteinlerinin değişimleri (Mavi-MMVD, Kırmızı-DCM'li olguları göstermektedir).



Şekil 26: Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum oksidatif stres parametreleri (Mavi - MMVD, Kırmızı - DCM'li olguları göstermektedir).



Şekil 27: C sınıfı hastalarda KC-like sitokin ve akut faz parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri. * P < 0,05 ve ** P < 0,01



Şekil 28: C sınıfı hastalarda oksidatif stres parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri. * P < 0,05

Tablo 20: Yangısal parametreler ile kardiyolojik parametreler arasındaki korelasyonlar

Parametre	Spearman's korelasyon testi						
WBC	cTnI ($\rho = 0.57$)	LA/Ao ($\rho = 0.55$)					
NEU	cTnI ($\rho = 0.62$)	FS ($\rho = -0.36$)	LA/Ao ($\rho = 0.60$)	WBC ($\rho = 0.96$)			
BUN	cTnI ($\rho = 0.40$)	WBC ($\rho = 0.50$)	NEU ($\rho = 0.56$)				
CRP	cTnI ($\rho = 0.39$)	LVDD ($\rho = 0.40$)	LA/Ao ($\rho = 0.60$)	WBC ($\rho = 0.56$)	NEU ($\rho = 0.60$)		
Ferritin	cTnI ($\rho = 0.51$)	LA/Ao ($\rho = 0.46$)	WBC ($\rho = 0.41$)	NEU ($\rho = 0.46$)	CRP ($\rho = 0.54$)	Hp ($\rho = 0.47$)	BChE ($\rho = 0.43$)
PON1	cTnI ($\rho = -0.41$)	LVDD ($\rho = -0.63$)	LVDS ($\rho = -0.49$)	LA/Ao ($\rho = -0.59$)	NEU ($\rho = -0.43$)	CRP ($\rho = -0.64$)	CUPRAC ($\rho = 0.67$)
BChE	ALT ($\rho = 0.38$)						
TEAC	LVDD ($\rho = -0.41$)	BUN ($\rho = -0.41$)	Hp ($\rho = -0.49$)	CUPRAC ($\rho = 0.87$)	thiol ($\rho = 0.90$)	PON1 ($\rho = 0.60$)	
CUPRAC	LVDD ($\rho = -0.51$)	ALT ($\rho = 0.38$)	CRP ($\rho = -0.51$)	Hp ($\rho = -0.53$)			
Thiol	LVDD ($\rho = -0.49$)	ALT ($\rho = 0.38$)	BUN ($\rho = -0.41$)	Cr ($\rho = -0.38$)	CRP ($\rho = -0.43$)	Hp ($\rho = -0.50$)	CUPRAC ($\rho = 0.89$)
IL-2	ALT ($\rho = -0.45$)	BChE ($\rho = -0.44$)	GM-CSF ($\rho = 0.70$)				
IL-6	GM-CSF ($\rho = 0.57$)	IL-2 ($\rho = 0.65$)					
IL-7	LA/Ao ($\rho = -0.44$)	ALT ($\rho = -0.37$)	BChE ($\rho = -0.38$)	GM-CSF ($\rho = 0.68$)	IL-2 ($\rho = 0.68$)	IL-6 ($\rho = 0.49$)	
IL-10	IFNg ($\rho = 0.49$)	KC-like ($\rho = 0.41$)					
IL-15	ALT ($\rho = -0.39$)	GM-CSF ($\rho = 0.85$)	IL-2 ($\rho = 0.78$)	IL-6 ($\rho = 0.70$)	IL-7 ($\rho = 0.67$)		
IL-18	GM-CSF ($\rho = 0.80$)	IL-2 ($\rho = 0.71$)	IL-6 ($\rho = 0.72$)	IL-7 ($\rho = 0.71$)	IL-15 ($\rho = 0.81$)		
IP-10	Cr ($\rho = 0.54$)						
MCP-1	cTnI ($\rho = 0.45$)	LVDD ($\rho = 0.38$)	BUN ($\rho = 0.39$)	Hp ($\rho = 0.40$)	Ferritin ($\rho = 0.38$)	IL-6 ($\rho = 0.66$)	
GM-CSF	LA/Ao ($\rho = -0.44$)	BChE ($\rho = -0.41$)					
KC-like	cTnI ($\rho = 0.45$)	LA/Ao ($\rho = 0.52$)	WBC ($\rho = 0.59$)	NEU ($\rho = 0.58$)	CRP ($\rho = 0.57$)	Hp ($\rho = 0.43$)	Ferritin ($\rho = 0.56$)
TNF-α	GM-CSF ($\rho = 0.65$)	IL-2 ($\rho = 0.85$)	IL-6 ($\rho = 0.73$)	IL-7 ($\rho = 0.71$)	IL-15 ($\rho = 0.76$)	IL-18 ($\rho = 0.78$)	

4.5.4. Serum Proteomik Bulguları: Serum proteomları *Canis lupus familiaris* (evcil köpek) veri tabanına göre listelenmiş; kontrol grubuna göre en az $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel fark gösteren proteomlar anlamlı kabul edilmiştir. Bu çalışmada *Canis lupus familiaris* için toplam 157, anlamlı olarak ise 29 farklı protein tespit edilmiştir. Tüm izole edilen serum proteomlarının accession numaraları, değişim oranları ve peptid sayıları gibi detayları Tablo 21’de aktarılmıştır.

Tüm proteinlerin PanterGo programı ile yapılan analizlerinde moleküler fonksiyonları (binding ve katalitik ve regülatör aktivite), biyolojik süreçlerde aldığı görevler (biyolojik regülasyon, hücrel ve immun sistem prosesleri ve signaling), hücrel yapıdaki dağılımları (sellüler anatomik lokalizasyon, intrasellüler ve protein içeren kompleksler), yolak analizleri (apoptosis, koagülasyon, CCKR signaling ve Parkinson hastalığı) ve protein sınıfları (immunite, transfer, protein bağlama ve protein modifiye eden enzimler) şekiller ile (Şekil 28-32) aktarılmıştır.

A (sağlıklı – kontrol) ve B2 sınıfları arasında serum protein ifade farklılıkları ile ilgili olarak; izole edilen platelet proteomlarının erişim (accession) numarası, peptid sayısı, değişim oranı (fold change) ve protein tanımlamaları Tablo 22’de, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına (m/z) göre genel dağılımları da Şekil 33’de gösterilmiştir. A sınıfına göre B2 sınıfında bir proteinde (angiotensinogen) artma (Şekil 34), 3 protein ise (lipopolysaccharide-binding protein, carboxypeptidase N subunit 2, immunoglobulin iota chain-like) azalma saptanmıştır (Şekil 35-37). B2 sınıfında immunoglobulin iota chain-like proteinin kontrole göre 24 kat azalması dikkate değer görülmüştür.

A (sağlıklı – kontrol) ve C sınıfları arasında serum protein ifade farklılıkları ile ilgili olarak; izole edilen platelet proteomlarının erişim (accession) numarası, peptid sayısı, değişim oranı (fold change) ve protein tanımlamaları Tablo 23’de, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına (m/z) göre genel dağılımları da Şekil 38’de gösterilmiştir. C sınıfında A sınıfı ile karşılaştırıldığında toplam 16 anlamlı protein değişim göstermiş; bunlardan 8 protein artarken (Şekil 39-46), 8 protein de azalma

göstermiştir (Şekil 47-53). Artan proteinler; complement C3, carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2, argininosuccinate lyase isoform X2, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X, nuclear mitotic apparatus protein 1 isoform X2 ve complement C4-A olarak listelenmiştir. Azalan proteinler; pigment epithelium-derived factor, complement component C7 isoform X2, complement factor I isoform X3, complement component C8 alpha chain isoform X1, actin_ cytoplasmic 1, complement factor D isoform X1, apolipoprotein C-II precursor ve hemopexin olarak belirlenmiştir. Azalan proteinlerde maksimum değişim gösterenler complement component C7 isoform X2 (2.77 kat) ve hemopexin (2.46 kat), artan proteinlerde de carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1 (3,09 kat) ve complement C3 (2,76 kat) öncelikli yer almıştır.

A (sağlıklı – kontrol) ve D sınıfları arasında serum protein ifade farklılıkları ile ilgili olarak; izole edilen platelet proteomlarının erişim (accession) numarası, peptid sayısı, değişim oranı (fold change) ve protein tanımlamaları Tablo 24’de, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına (m/z) göre genel dağılımları da Şekil 55’de gösterilmiştir. D sınıfında A sınıfı ile karşılaştırıldığında toplam 12 serum proteininde anlamlı değişim belirlenmiş; iki protein (nuclear mitotic apparatus protein 1 isoform X2 ve lipopolysaccharide-binding protein) artış gösterirken (Şekil 56-57), 10 proteinde (serum paraoxonase/arylesterase 1, serum albumin precursor, serum albumin isoform X1, platelet basic protein precursor, fetuin-B, adiponectin isoform X2, actin_ cytoplasmic 1, tetranectin, immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38 ve angiotensinogen) azalma belirlenmiştir (Şekil 58-67). Artan proteinlerden lipopolysaccharide-binding protein 3,53 kat kontrol değerlerden daha yüksek elde edilmişken, azalan proteinlerden ilk sıraları serum albumin precursor (4,97 kat), serum albumin isoform X1 (4,97 kat) ve immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38 (4,49 kat) almıştır.

A (sağlıklı – kontrol) ve C sınıfı hastaların tedavi sonraki değerleri arasında serum protein ifade farklılıkları ile ilgili olarak; izole edilen platelet proteomlarının erişim

(accession) numarası, peptid sayısı, değişim oranı (fold chance) ve protein tanımlamaları Tablo 25’de, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına (m/z) göre genel dağılımları da Şekil 68’de gösterilmiştir. Tedavi sonrası değerler A sınıfı ile karşılaştırıldığında toplam 9 protein istatistiksel düzeyde değişim göstermiştir. Tedavi ile birlikte iki protein (complement C3 ve carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1) artmış (Şekil 69-70), diğer taraftan 7 proteinde ise (actin-cytoplasmic 1, fetuin-B, immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38, complement factor H, angiotensinogen, serum albumin precursor ve serum albumin isoform X1) azalma gözlenmiştir (Şekil 71-77). Tedavi ile birlikte kontrole göre complement C3’ün 1,77 kat ve carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1 2,12 kat arttığı, oysa serum albumin precursor’ün 3,53 kat ve immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38’in de 2,69 kat azaldığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada *Canis lupus familiaris* protein veri bankasına göre tanımlanan tüm proteinler ve bu proteinlerin birbiri ile olan ilişkisi string analizi ile irdelendiğinde komplement sistemin kendi arasında (C1, C2 ve C4), fetuin, serpin ve hemopexinin ise diğer proteinlerle olan moleküler ve biyolojik ilişkisi dikkat çekici bulunmuştur (Şekil 78).

Tablo 21: Kontrol grubuna göre kalp yetmezlikli köpeklerde tespit edilen tüm proteinlerin (istatistiksel olarak anlamlı ve anlamsız) isim, peptid sayıları ve tanımlamaları

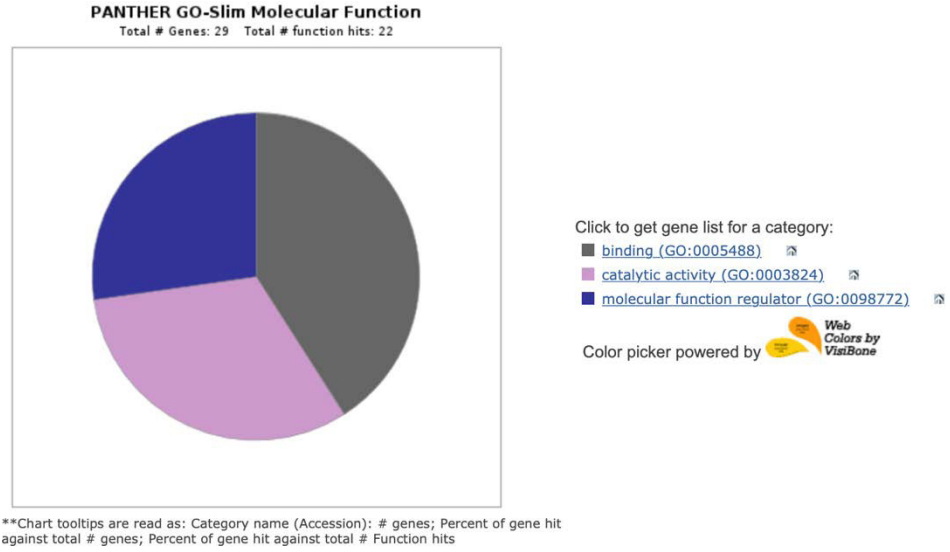
Accession No	Peptid sayısı	Güven Skoru	Kütle	Tanımlanmış protein ismi
NP_001182774.2	8	71,1267	42079,017	actin_cytoplasmic 1
XP_535835.2	10	84,8687	43188,7706	fetuin-B
XP_005639693.1	4	36,4206	59990,3151	carboxypeptidase N subunit 2
XP_542993.3	7	48,5286	53478,088	lipopolysaccharide-binding protein
XP_013977853.1	4	25,3048	36985,6351	complement factor D isoform X1
XP_022281488.1	126	1239,1701	194674,8394	complement C4-A
XP_005618890.1	14	108,1516	51977,8712	angiotensinogen
NP_001003026.1	72	745,8008	70600,5605	serum albumin precursor
XP_005628024.1	82	754,1669	70602,533	serum albumin isoform X1
XP_005633270.2	30	211,8986	180640,865	complement C3

XP_005630653.1	150	1172,1034	519755,555	apolipoprotein B-100
NP_001003221.1	1	6,2576	37086,4588	cAMP-responsive element modulator
XP_534989.4	6	61,3779	51067,6591	carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1
XP_022280728.1	58	601,4243	37281,4302	apolipoprotein E
XP_005639866.1	6	38,5876	62531,0195	histidine-rich glycoprotein isoform X1
XP_022266304.1	18	216,2853	25090,0557	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38 [Canis lupus familiaris]
XP_022273600.1	12	72,8015	92752,0143	complement component C7 isoform X2 [Canis lupus familiaris]
XP_022266499.1	2	12,0979	26390,9068	immunoglobulin iota chain-like [Canis lupus familiaris]
NP_001301045.1	5	38,7643	25554,2865	C-reactive protein precursor
XP_853676.1	14	94,2761	52079,3464	hemopexin
XP_535195.2	50	455,0048	107374,4708	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2
NP_001071056.2	14	104,224	44321,0543	pigment epithelium-derived factor
XP_536110.2	55	430,6062	144352,0032	complement factor H
XP_003433491.1	19	165,5129	56957,1203	heparin cofactor 2
XP_005642305.2	69	703,8903	105648,2249	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1
XP_848765.4	77	735,3425	101575,7103	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X3
XP_544507.2	9	76,4155	26524,1334	complement C1q subcomponent subunit B
XP_022273595.1	12	80,8649	109242,1307	complement component C6
XP_022262838.1	206	1872,7394	177621,9674	complement C3
XP_013977971.1	3	23,3156	207812,926	nuclear mitotic apparatus protein 1 isoform X2
XP_532697.2	36	297,1865	97383,798	fibrinogen alpha chain
XP_534901.2	21	146,7609	81670,4964	complement C1r subcomponent
NP_001295463.1	13	109,9691	39207,3662	CD5 antigen-like precursor
XP_003433793.1	7	47,9695	25867,2336	complement C1q subcomponent subunit C
XP_022280741.1	48	386,0816	185537,3757	complement C5
XP_022269775.1	7	54,0993	26454,729	adiponectin isoform X2
XP_005622368.1	36	251,7129	70603,5403	C4b-binding protein alpha chain
NP_001003369.2	6	76,3435	10989,4473	apolipoprotein C-III precursor
XP_013969620.1	5	46,5394	49065,8309	argininosuccinate lyase isoform X2
XP_005639325.1	10	67,8604	69550,6157	complement factor I isoform X3
NP_001003370.1	32	277,1694	52360,2119	clusterin precursor
XP_013977261.1	2	22,5196	19499,0865	tetranectin
XP_003431724.1	35	274,3179	87690,0382	complement factor B
XP_022264446.1	26	218,3364	126718,7194	ceruloplasmin isoform X1
XP_013965532.1	51	319,0327	325084,8146	centromere-associated protein E isoform X1
NP_001165243.2	3	29,0277	13252,5005	platelet basic protein precursor
XP_022278059.1	10	59,4492	46321,5882	alpha-1-antitrypsin-like
XP_005633787.1	11	101,1844	14395,8622	serum amyloid A protein isoform X1 serum amyloid A protein precursor
NP_001257814.1	8	88,0156	15462,5736	hemoglobin subunit alpha-like
XP_022280742.1	46	433,285	88762,0923	gelsolin

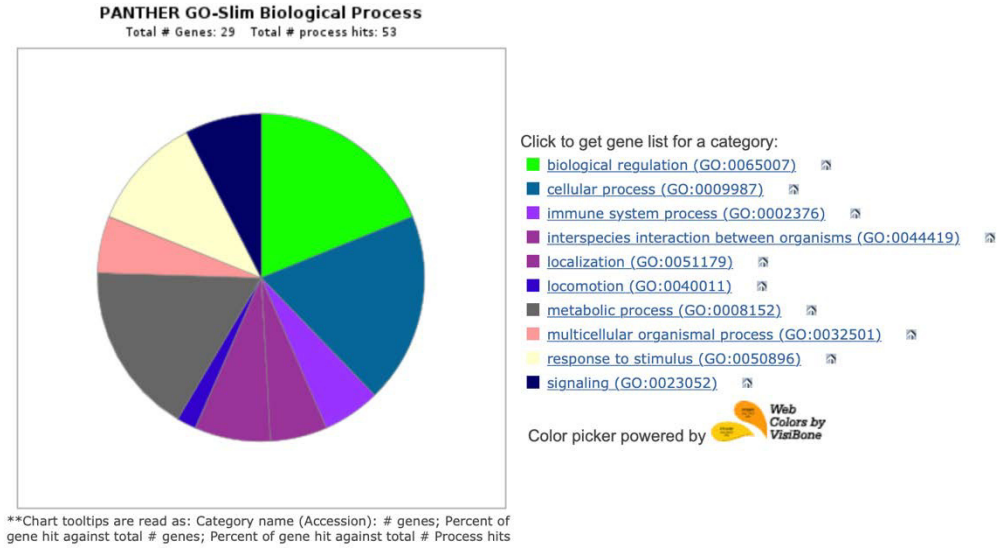
XP_005639872.1	5	40,4014	81461,0979	mannan-binding lectin serine protease 1 isoform X6
XP_533794.2	28	257,3294	101454,3623	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 isoform X1
XP_005632489.1	26	226,2761	91897,3164	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 isoform X3
XP_022273152.1	4	22,2957	501458,9568	ankyrin-3 isoform X1
NP_001157926.1	8	63,3315	25456,3588	glutathione peroxidase 3 precursor
XP_013966462.1	138	1295,4668	242337,257	fibronectin isoform X11
XP_013966458.1	140	1348,3187	255505,9715	fibronectin isoform X7
XP_546510.3	89	893,2923	43821,3044	apolipoprotein A-IV
XP_851611.1	2	14,768	29398,0524	C4b-binding protein beta chain
XP_854040.1	8	57,0056	54504,3275	vitronectin
XP_537187.4	58	530,416	53036,7299	antithrombin-III
XP_005640136.1	27	233,8101	93469,3653	phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D isoform X1
XP_022279349.1	1	6,0538	29091,0017	ficolin-2 isoform X2
XP_534969.3	5	36,6319	23266,0721	retinol-binding protein 4
XP_538807.3	8	62,0142	39769,6989	protein AMBP
XP_005619145.1	2	18,1191	26122,4965	mannose-binding protein C
XP_534893.3	61	545,5736	166644,8807	alpha-2-macroglobulin
XP_022278060.1	6	45,4703	45993,3554	plasma serine protease inhibitor
XP_013973817.2	19	140,1307	87714,328	complement C2 isoform X1
XP_005629424.1	7	52,6119	56994,9672	fibrinogen beta chain
XP_003431634.1	2	13,9861	23533,5696	alpha-1-acid glycoprotein 1
XP_537290.1	8	61,0963	15982,3057	transthyretin
XP_005634506.1	7	56,9944	79187,0527	serotransferrin isoform X1
XP_863385.2	7	52,9262	72397,0292	78 kDa glucose-regulated protein
XP_532698.2	25	214,9544	50058,8674	fibrinogen gamma chain isoform X2
XP_022266315.1	19	217,4408	24626,389	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X50
NP_001003368.1	4	31,9959	11226,7757	apolipoprotein C-II precursor
XP_539716.1	5	43,2089	38689,2278	lumican
XP_537723.3	1	7,7067	15607,9611	C-C motif chemokine 14
XP_005639865.1	13	115,5549	40046,3918	alpha-2-HS-glycoprotein
XP_013963436.1	20	124,5121	239604,4657	citron Rho-interacting kinase isoform X3
XP_850219.1	5	33,6701	40267,9585	serum paraoxonase/arylesterase 1
XP_005630499.1	3	21,7074	130605,7297	zinc finger CCCH domain-containing protein 6 isoform X1
XP_003639742.1	23	171,189	71729,1396	prothrombin [Canis lupus familiaris]
XP_535424.1	5	35,9611	42361,2493	actin_ alpha cardiac muscle 1
XP_022269453.1	27	194,6618	116905,0753	vitamin K-dependent protein S
XP_005637230.1	63	525,9069	168106,659	pregnancy zone protein-like isoform X1
XP_535367.1	5	39,9616	26166,6066	complement C1q subcomponent subunit A
XP_022260820.1	16	136,5335	44245,0331	plasma protease C1 inhibitor
XP_022266311.1	16	183,5789	24919,8908	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X46
XP_005626932.1	3	22,7052	40034,4403	fructose-bisphosphate aldolase B isoform X2
XP_022274751.1	8	60,4508	67568,9232	cadherin-1-like isoform X2

XP_003434170.1	19	156,8704	73912,0218	kininogen-1 isoform X1
XP_005637267.1	23	205,2328	79070,2871	complement C1s subcomponent
XP_005616468.1	3	16,1816	98246,4076	serine/threonine-protein kinase D2 isoform X1
XP_003639070.1	7	44,3839	67913,3771	complement component C8 alpha chain isoform X1
XP_022277465.1	41	336,707	46990,9646	alpha-1-antitrypsin isoform X1
NP_001300728.1	7	67,927	11282,0913	apolipoprotein A-II precursor
NP_001003265.1	10	74,9746	39714,8658	beta-2-glycoprotein 1 precursor
XP_005619427.1	8	70,5733	65031,9685	complement component C9
NP_001257813.1	15	129,8744	16241,6383	hemoglobin subunit beta-like
NP_001183977.1	12	100,5248	9741,4324	apolipoprotein C-I precursor
XP_022266965.1	56	463,378	135728,9023	pregnancy zone protein-like isoform X3
XP_532398.2	12	88,8515	18708,0462	immunoglobulin J chain
XP_013965764.1	1	7,0891	23419,913	apolipoprotein D
XP_005628336.1	16	112,604	54571,3889	vitamin D-binding protein
XP_850996.1	35	316,6999	38839,0582	haptoglobin-like
XP_544610.3	7	54,4712	133605,1783	thrombospondin-1
XP_022276544.1	2	13,7251	21729,8674	cofilin-1-like
XP_022279160.1	33	281,6287	55181,4121	alpha-2-antiplasmin isoform X1
NP_001273889.1	28	239,27	93907,1149	plasminogen precursor
XP_536694.2	9	68,2309	68709,8622	complement component C8 beta chain
XP_005616085.1	20	167,0171	61984,4331	alpha-1B-glycoprotein
XP_548489.4	28	263,0712	105665,8995	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3
XP_013968873.1	106	934,6655	30181,1817	apolipoprotein A-I
XP_534268.4	63	594,5436	80273,3971	serotransferrin
XP_535836.1	18	150,6863	49431,3276	kininogen-1 isoform X2
XP_005636398.1	1	5,2289	126359,6048	squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 isoform X1
NP_001003050.1	7	61,895	12130,3425	serum amyloid A1 precursor
XP_022278188.1	2	14,2608	29965,9003	uncharacterized protein LOC100683065
XP_005636621.1	13	112,9696	22458,3523	immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
XP_854692.2	10	77,0881	39272,0543	leucine-rich alpha-2-glycoprotein
XP_005623826.1	4	24,0542	48039,4254	kallistatin
XP_005623829.1	24	190,9939	47368,1946	alpha-1-antichymotrypsin
XP_005626342.1	1	7,0333	63185,3284	transcription complex subunit 6 isoform X2
XP_005636600.1	17	206,9539	25096,9635	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X34
XP_013963625.1	17	225,5063	25517,24	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X6 immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X2
XP_013963626.1	17	215,9041	25507,2015	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X7
XP_013963629.1	15	198,9706	25547,3097	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X1
XP_013963631.1	17	224,0285	25533,2828	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X9
XP_013963638.1	17	215,9674	25501,3512	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X20 immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X11
XP_013963653.1	21	258,639	25468,2175	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X28
XP_013963658.1	17	207,9209	24992,9421	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X41

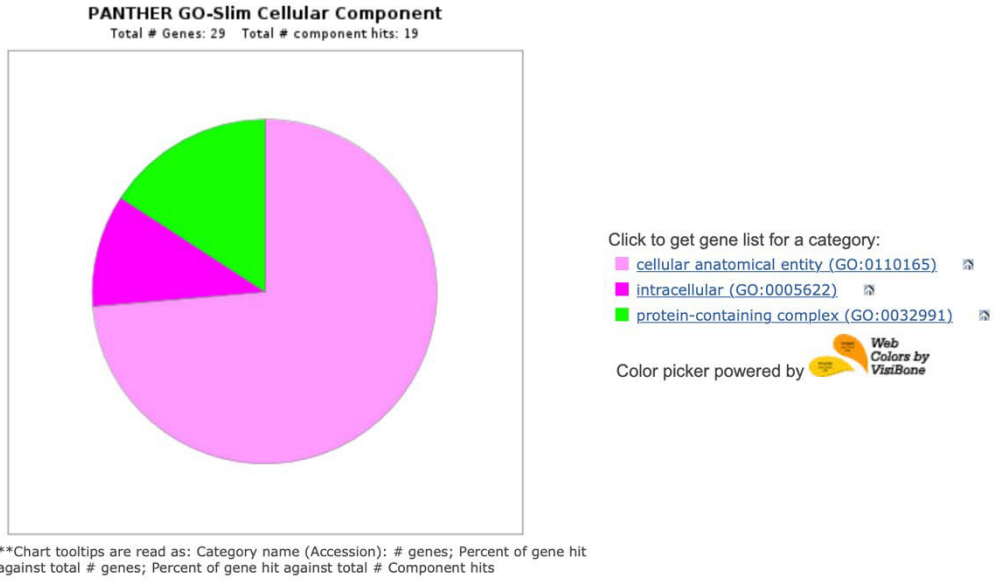
XP_013963659.1	15	190,9874	25033,0503	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X33
XP_013963660.1	17	216,0453	25019,0234	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X43
XP_013966084.1	24	191,9153	89830,3847	phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D isoform X3
XP_022266277.1	15	200,4484	25531,2669	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X3
XP_022266278.1	15	190,8462	25521,2284	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X4
XP_022266279.1	15	190,9307	25533,2828	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X5
XP_022266280.1	17	215,9886	25519,2559	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X8
XP_022266281.1	13	174,7896	25262,983	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X10
XP_022266283.1	15	190,2796	25505,4232	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X12
XP_022266284.1	15	190,9095	25515,3781	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X14
XP_022266286.1	19	233,5811	25595,4039	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X16
XP_022266289.1	17	215,3375	25491,3963	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X21
XP_022266293.1	15	199,8475	25264,9555	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X24
XP_022266297.1	13	165,5948	25158,8155	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X30
XP_022266298.1	15	190,6527	25144,7886	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X31
XP_022266300.1	15	208,7954	24865,7502	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X32
XP_022266303.1	15	200,671	24839,6689	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X37
XP_022266305.1	15	182,863	25006,969	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X39
XP_022266306.1	17	225,7289	24825,642	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X40
XP_022266308.1	17	233,8533	24851,7233	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X42
XP_022266309.1	19	232,0118	25082,9366	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X44
XP_022266312.1	17	208,6368	24905,8639	immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X47
XP_022279161.1	22	234,9051	62367,5382	alpha-2-antiplasmin isoform X3



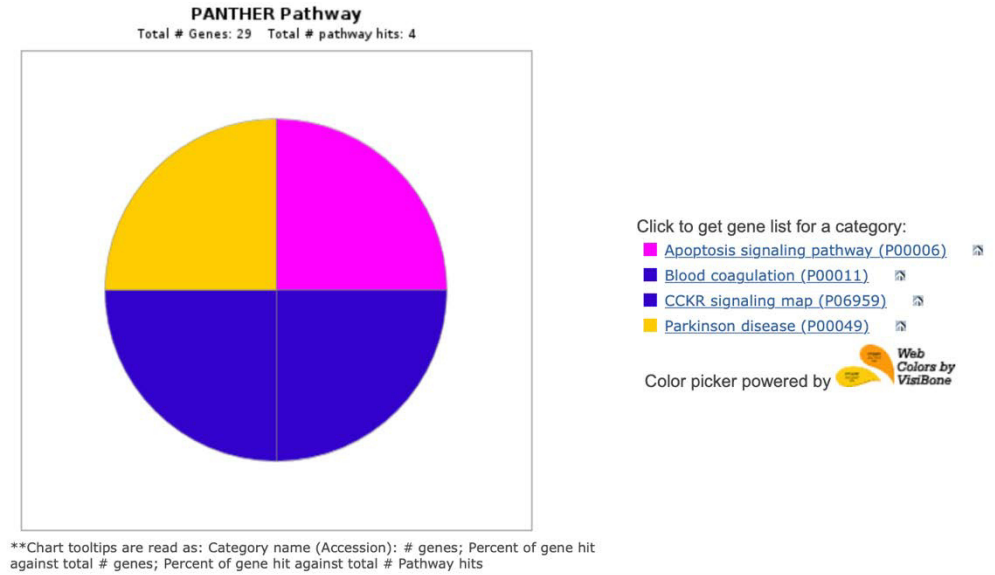
Şekil 29: Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının moleküler fonksiyonları



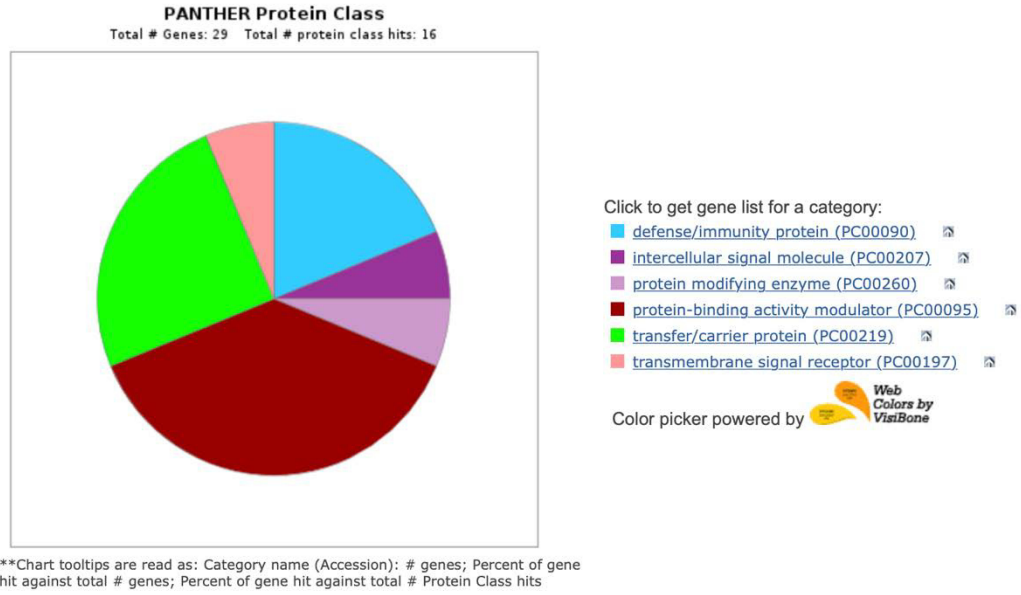
Şekil 30: Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının biyolojik fonksiyonları



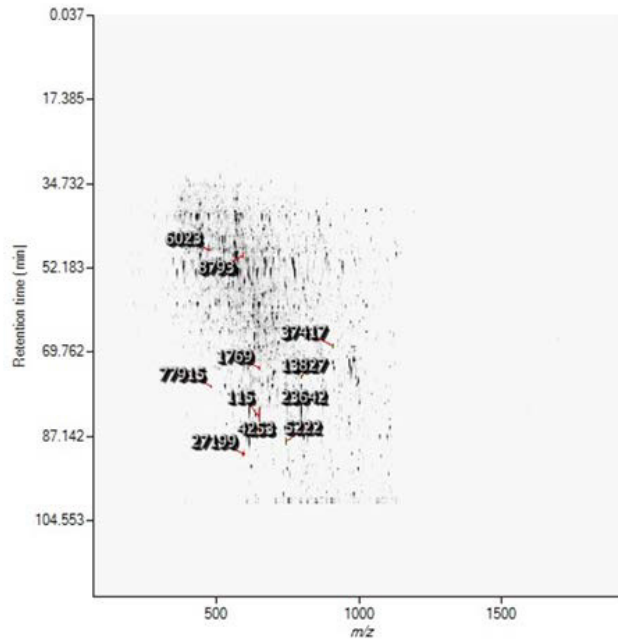
Şekil 31: Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının selüler yapılarıdaki dağılımları



Şekil 32: Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının yolak analizi



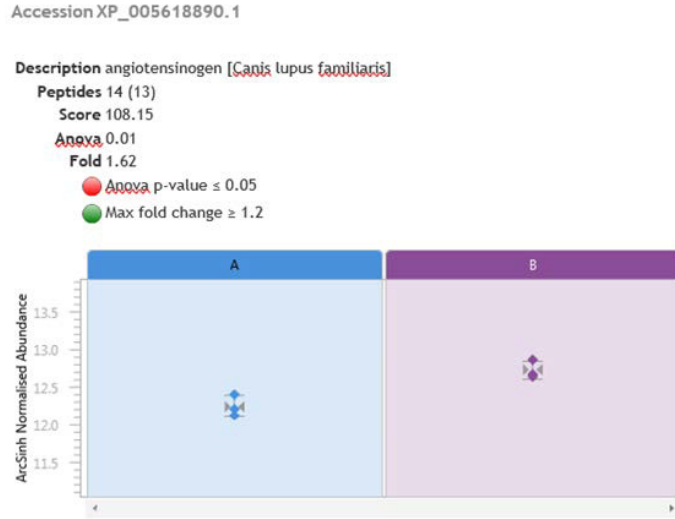
Şekil 33: Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının protein sınıfları



Şekil 34: Bu çalışmada kontrol grubuna göre B grubunda izole edilen istatistiksel düzeyde anlamlı serum proteomlarının accession numaraları, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına göre dağılımları

Tablo 22: Kontrol ve B sınıfı hasta grubunda ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren serum proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Tags	Description	Average Normalised Abundances	
							A	B
XP_005618890.1	14 (13)	108.15	0.01	1.62		angiotensinogen [Canis lupus familiaris]	1.05e+005	1.70e+005
XP_542993.3	7 (7)	48.53	2.47e-003	1.72		lipopolysaccharide-binding protein [Canis lupus familiaris]	904.12	526.17
XP_005639693.1	4 (4)	36.42	0.01	1.58		carboxypeptidase N subunit 2 [Canis lupus familiaris]	4242.70	2680.25
XP_022266499.1	2 (2)	12.10	0.05	24.48		immunoglobulin iota chain-like [Canis lupus familiaris]	2695.77	110.12



Şekil 35: Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda serum angiotensinogen düzeyindeki değişim

Accession XP_542993.3

Description lipopolysaccharide-binding protein [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 7 (7)

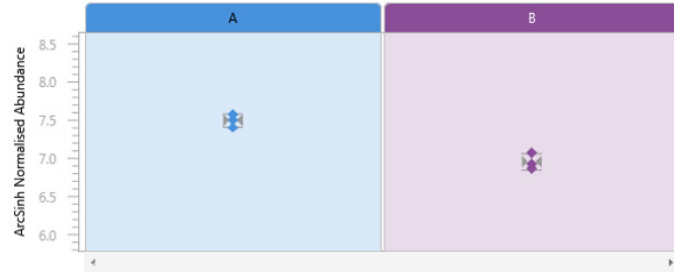
Score 48.53

Anova 2.47e-003

Fold 1.72

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 36: Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda lipopolysaccharide binding protein düzeyindeki değişim

Accession XP_022266499.1

Description immunoglobulin iota chain-like [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 2 (2)

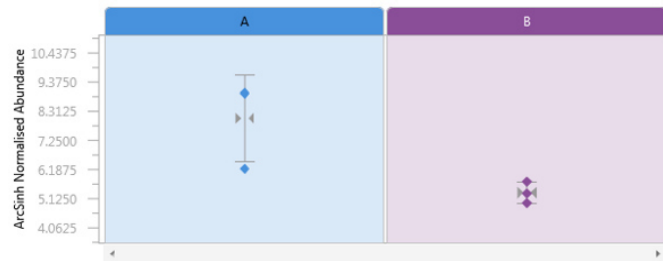
Score 12.10

Anova 0.05

Fold 24.48

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 37: Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda immunoglobulin iota chain-like düzeyindeki değişim

Accession XP_005639693.1

Description carboxypeptidase N subunit 2 [Canis lupus familiaris]

Peptides 4 (4)

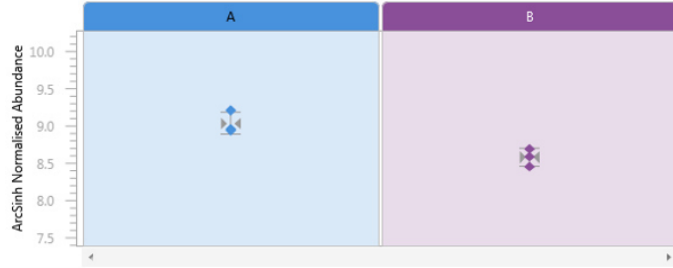
Score 36.42

Anova 0.01

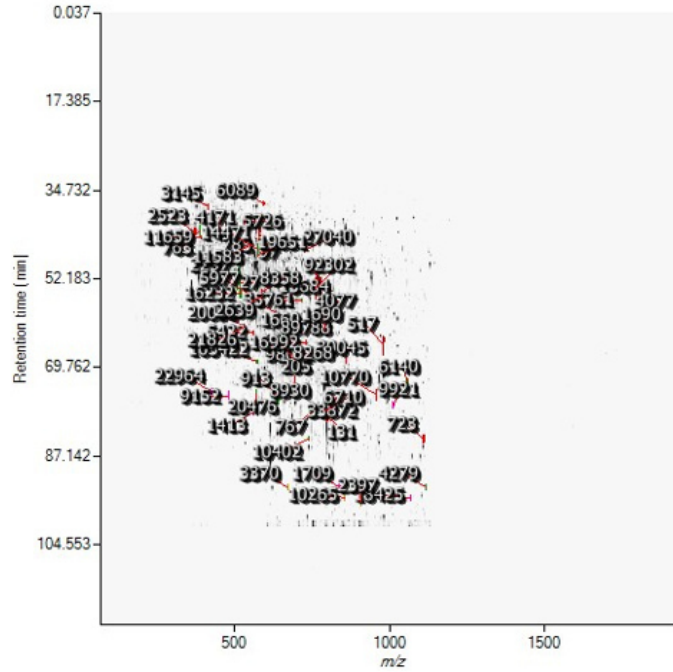
Fold 1.58

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 38: Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda carboxypeptidase N subunit 2 düzeyindeki değişim



Şekil 39: Bu çalışmada kontrol grubuna göre C grubunda izole edilen istatistiksel düzeyde anlamlı serum proteomlarının accession numaraları, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına göre dağılımlar

Tablo 23: Kontrol ve C sınıfı hasta grubunda ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren serum proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Tags	Description	Average Normalised Abundances	
							A	C
XP_022281488.1	126 (124)	1239.17	0.05	1.67		complement C4-A [<i>Canis lupus familiaris</i>]	3.79e+005	6.33e+005
XP_848765.4	77 (10)	735.34	0.04	2.58		inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X3 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	7.92e+004	2.04e+005
XP_005642305.2	69 (2)	703.89	0.04	2.58		inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	1.29e+004	3.32e+004
XP_535195.2	50 (47)	455.00	0.01	1.76		inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	3.51e+004	6.17e+004
XP_005633270.2	30 (30)	211.90	7.08e-003	2.76		complement C3 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	1.28e+004	3.53e+004
NP_001071056.2	14 (13)	104.22	0.01	1.68		pigment epithelium-derived factor [<i>Canis lupus familiaris</i>]	4365.49	2598.86
XP_853676.1	14 (14)	94.28	0.04	2.46		hemopexin [<i>Canis lupus familiaris</i>]	2.48e+004	1.01e+004
XP_022273600.1	12 (12)	72.80	0.03	2.77		complement component C7 isoform X2 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	1.84e+004	6641.68
NP_001182774.2	8 (5)	71.13	0.03	1.47		actin_cytoplasmic 1 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	1.11e+005	7.55e+004
XP_005639325.1	10 (10)	67.86	0.03	1.57		complement factor I isoform X3 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	7605.21	4833.88
XP_534989.4	6 (6)	61.38	0.01	3.09		carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	2219.82	6858.16
XP_013969620.1	5 (5)	46.54	0.02	2.75		argininosuccinate lyase isoform X2 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	613.48	1685.56
XP_003639070.1	7 (7)	44.38	0.03	1.67		complement component C8 alpha chain isoform X1 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	6446.22	3860.34
NP_001003368.1	4 (4)	32.00	0.04	1.75		apolipoprotein C-II precursor [<i>Canis lupus familiaris</i>]	4707.68	2687.92
XP_013977853.1	4 (4)	25.30	0.04	1.90		complement factor D isoform X1 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	1934.71	1016.85
XP_013977971.1	3 (2)	23.32	0.04	1.64		nuclear mitotic apparatus protein 1 isoform X2 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	228.88	375.83

Accession XP_013969620.1 (+1)

Description argininosuccinate lyase isoform X2 [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 5 (5)

Score 46.54

Anova 0.02

Fold 2.75

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 40: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda argininosuccinate lysase düzeyindeki değişim

Accession XP_534989.4 (+1)

Description carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1 [Çağış lupus familiaris]

Peptides 6 (6)

Score 61.38

Anova 0.01

Fold 3.09

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 1.2



Şekil 41: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1 düzeyindeki değişim

Accession XP_005633270.2

Description complement C3 [Çağış lupus familiaris]

Peptides 30 (30)

Score 211.90

Anova 7.08e-003

Fold 2.76

- Anova p-value ≤ 0.05
- Max fold change ≥ 1.2



Şekil 42: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement C3 düzeyindeki değişim

Accession XP_022281488.1

Description complement C4-A [Çağıs lupus familiaris]

Peptides 126 (124)

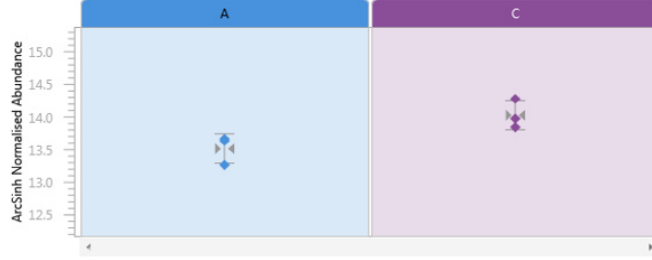
Score 1239.17

Anova 0.05

Fold 1.67

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 43: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement C4-A düzeyindeki değişim

Accession XP_535195.2

Description inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 [Çağıs lupus familiaris]

Peptides 50 (47)

Score 455.00

Anova 0.01

Fold 1.76

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 44: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda ITIH2 düzeyindeki değişim

Accession XP_005642305.2 (+1)

Description inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1 [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 69 (2)

Score 703.89

Anova 0.04

Fold 2.58

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 45: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda ITIH4 isoform X1 düzeyindeki değişim

Accession XP_848765.4

Description inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X3 [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 77 (10)

Score 735.34

Anova 0.04

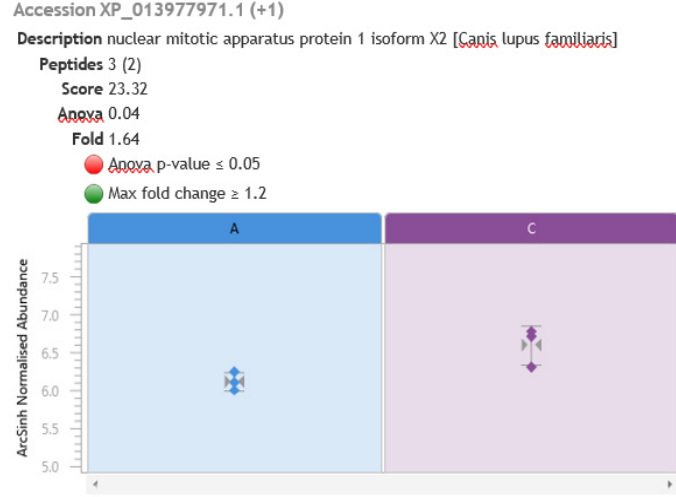
Fold 2.58

● Anova p-value ≤ 0.05

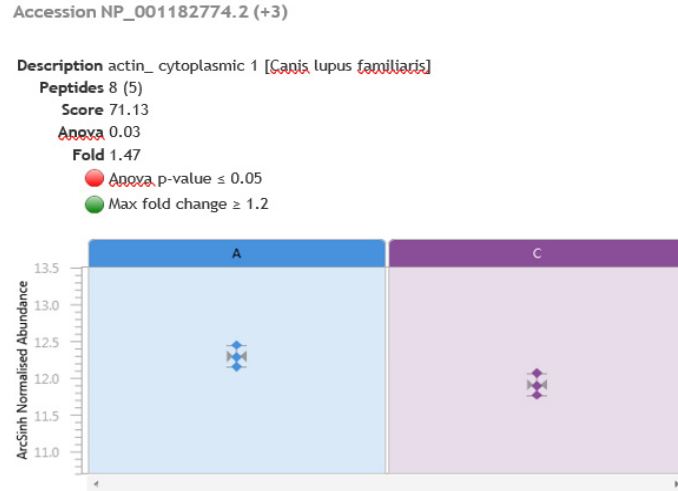
● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 46: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda ITIH4 isoform X3 düzeyindeki değişim



Şekil 47: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda NUMA1 düzeyindeki değişim



Şekil 48: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda actin cytoplasmic 1 düzeyindeki değişim

Accession NP_001003368.1 (+1)

Description apolipoprotein C-II precursor [Canis lupus familiaris]

Peptides 4 (4)

Score 32.00

Anova 0.04

Fold 1.75

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 49: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda apolipoprotein C-II precursor düzeyindeki değişim

Accession XP_022273600.1 (+1)

Description complement component C7 isoform X2 [Canis lupus familiaris]

Peptides 12 (12)

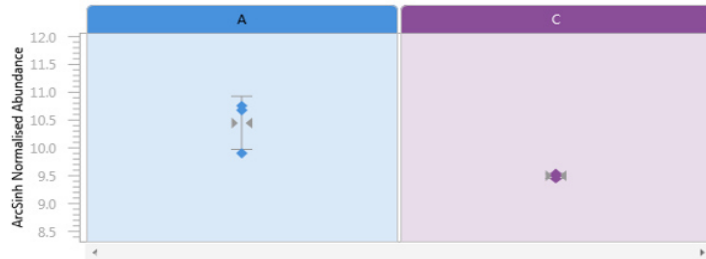
Score 72.80

Anova 0.03

Fold 2.77

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 50: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement component C7 düzeyindeki değişim

Accession XP_003639070.1 (+1)

Description complement component C8 alpha chain isoform X1 [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 7 (7)

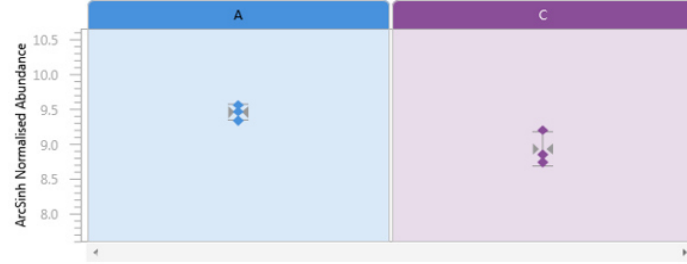
Score 44.38

Anova 0.03

Fold 1.67

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 51: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement component C8 alpha chain düzeyindeki değişim

Accession XP_005639325.1 (+3)

Description complement factor I isoform X3 [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 10 (10)

Score 67.86

Anova 0.03

Fold 1.57

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 52: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement factor I düzeyindeki değişim

Accession XP_013977853.1 (+1)

Description complement factor D isoform X1 [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 4 (4)

Score 25.30

Anova 0.04

Fold 1.90

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 53: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement factor D düzeyindeki değişim

Accession XP_853676.1

Description hemopexin [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 14 (14)

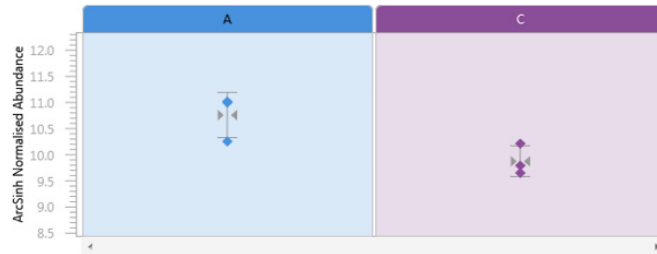
Score 94.28

Anova 0.04

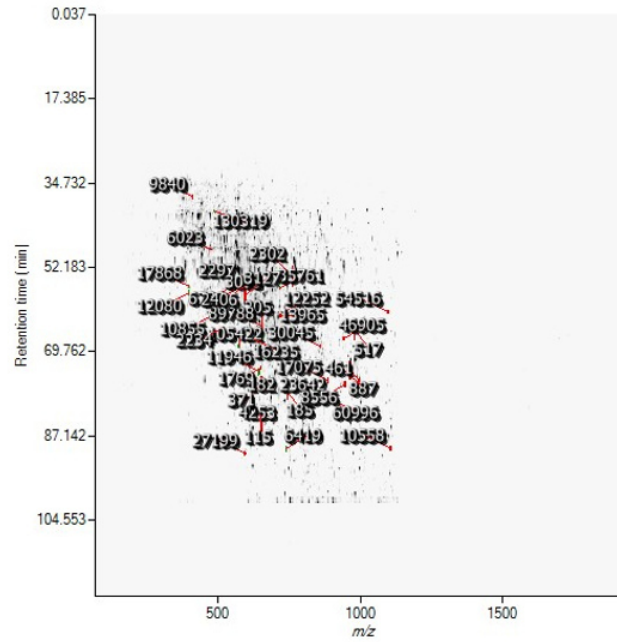
Fold 2.46

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 54: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda hemopexin düzeyindeki değişim



Şekil 55: Bu çalışmada kontrol grubuna göre D grubunda izole edilen istatistiksel düzeyde anlamlı serum proteomlarının accession numaraları, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına göre dağılımlar

Tablo 24: Kontrol ve D sınıfı hasta grubunda ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren serum proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları

Accession	Peptides	Score	Anova (P)*	Fold	Tags	Description	Average Normalised Abundances	
							A	D
XP_005628024.1	82 (13)	754.17	4.34e-003	4.97		serum albumin isoform X1 [Canis lupus familiaris]	2.41e+005	4.85e+004
NP_001003026.1	72 (3)	745.80	4.34e-003	4.97		serum albumin precursor [Canis lupus familiaris]	3.49e+004	7022.74
XP_022266304.1	18 (2)	216.29	0.03	4.49		immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38 [Canis lupus familiaris]	3855.45	858.80
XP_005618890.1	14 (13)	108.15	0.04	1.54		angiotensinogen [Canis lupus familiaris]	1.05e+005	6.80e+004
XP_535835.2	10 (10)	84.87	9.17e-003	2.91		fetuin-B [Canis lupus familiaris]	3.08e+004	1.06e+004
NP_001182774.2	8 (5)	71.13	0.02	1.96		actin_cytoplasmic 1 [Canis lupus familiaris]	1.11e+005	5.65e+004
XP_022269775.1	7 (7)	54.10	0.02	1.74		adiponectin isoform X2 [Canis lupus familiaris]*AXP_022269774.1 adiponectin isoform X2 [Canis lupus familiaris]*AXP_005639771.1 adiponectin isoform X2 [Canis lupus familiaris]	8152.00	4674.06
XP_542993.3	7 (7)	48.53	0.05	3.53		lipopolysaccharide-binding protein [Canis lupus familiaris]	904.12	3193.92
XP_850219.1	5 (4)	33.67	1.45e-003	2.91		serum paraoxonase/arylesterase 1 [Canis lupus familiaris]	6948.47	2383.80
NP_001165243.2	3 (3)	29.03	8.74e-003	2.38		platelet basic protein precursor [Canis lupus familiaris]	2303.04	968.75
XP_013977971.1	3 (2)	23.32	0.02	1.52		nuclear mitotic apparatus protein 1 isoform X2 [Canis lupus familiaris]	228.88	347.00
XP_013977261.1	2 (2)	22.52	0.02	2.91		tetranectin [Canis lupus familiaris]	2878.07	987.55

Accession XP_542993.3

Description lipopolysaccharide-binding protein [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 7 (7)

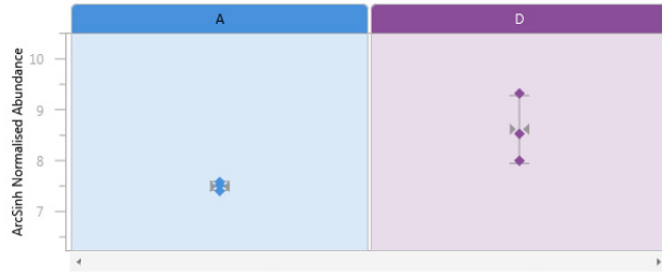
Score 48.53

Anova 0.05

Fold 3.53

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 56: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda lipopolisaccaride binding protein düzeyindeki değişim

Accession XP_013977971.1 (+1)

Description nuclear mitotic apparatus protein 1 isoform X2 [*Canis lupus familiaris*]

Peptides 3 (2)

Score 23.32

Anova 0.02

Fold 1.52

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 57: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda NUMA1 düzeyindeki değişim

Accession NP_001182774.2 (+3)

Description actin_cytoplasmic 1 [Canis lupus familiaris]

Peptides 8 (5)

Score 71.13

Anova 0.02

Fold 1.96

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 58: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda actin cytoplasmic 1 düzeyindeki değişim

Accession XP_022269775.1 (+2)

Description adiponectin isoform X2 [Canis lupus familiaris]^AXP_022269774.1 adiponectin isoform X2 [Canis lupus familiaris]^AXP_005639771.1 adiponectin isoform X2 [Canis lupus familiaris]

Peptides 7 (7)

Score 54.10

Anova 0.02

Fold 1.74

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 59: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda adiponektin düzeyindeki değişim



Şekil 60: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda angiotensinogen düzeyindeki değişim



Şekil 61: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda fetuin-B düzeyindeki değişim

Accession XP_022266304.1

Description immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38 [Canis lupus familiaris]

Peptides 18 (2)

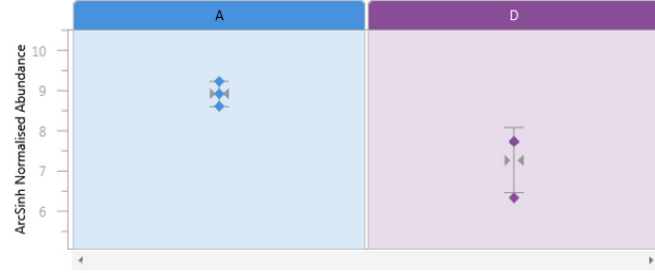
Score 216.29

Anova 0.03

Fold 4.49

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 62: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda immunoglobulin lambda-1 light chain düzeyindeki değişim

Accession NP_001165243.2

Description platelet basic protein precursor [Canis lupus familiaris]

Peptides 3 (3)

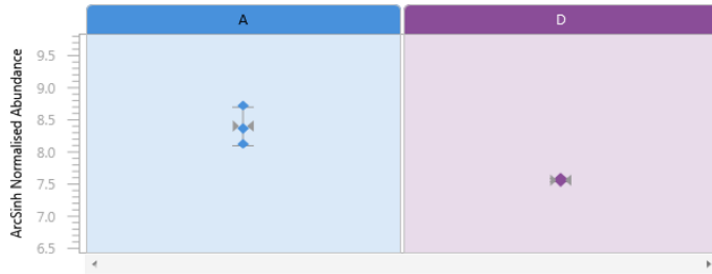
Score 29.03

Anova 8.74e-003

Fold 2.38

Anova p-value ≤ 0.05

Max fold change ≥ 1.2



Şekil 63: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda platelet basic protein precursor düzeyindeki değişim

Accession XP_005628024.1 (+1)

Description serum albumin isoform X1 [Canis lupus familiaris]

Peptides 82 (13)

Score 754.17

Anova 4.34e-003

Fold 4.97

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 64: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda serum albumin isoform düzeyindeki değişim

Accession NP_001003026.1

Description serum albumin precursor [Canis lupus familiaris]

Peptides 72 (3)

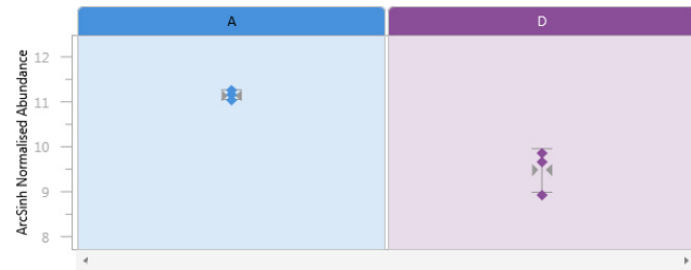
Score 745.80

Anova 4.34e-003

Fold 4.97

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 65: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda serum albumin precursor düzeyindeki değişim

Accession XP_850219.1

Description serum paraoxonase/arylesterase 1 [Canis lupus familiaris]

Peptides 5 (4)

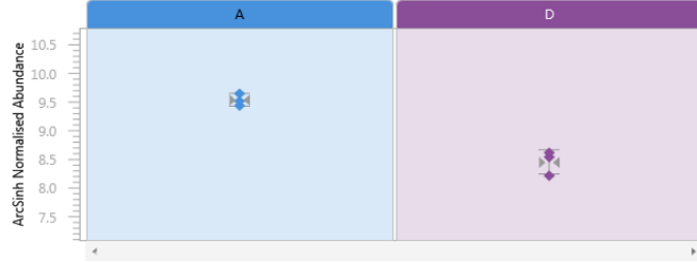
Score 33.67

Anova 1.45e-003

Fold 2.91

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 66: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda serum paraoxonase/arylesterase 1 düzeyindeki değişim

Accession XP_013977261.1

Description tetranectin [Canis lupus familiaris]

Peptides 2 (2)

Score 22.52

Anova 0.02

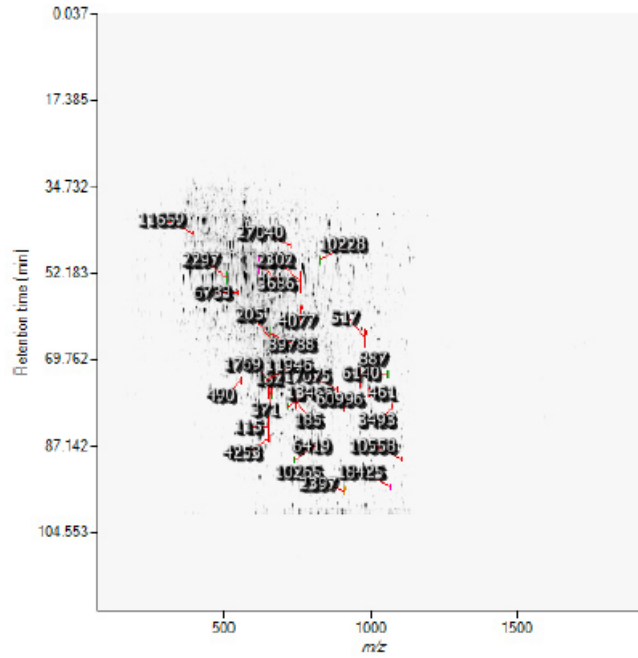
Fold 2.91

● Anova p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



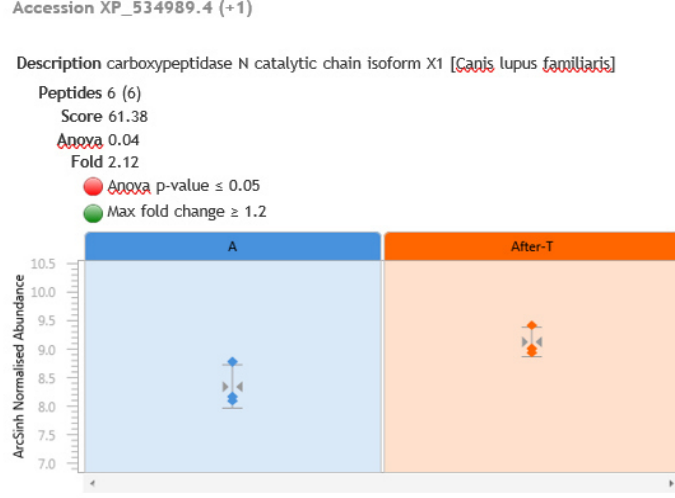
Şekil 67: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda tetranectin düzeyindeki değişim



Şekil 68: Bu çalışmada kontrol grubuna göre tedavi sonrası grubunda izole edilen istatistiksel düzeyde anlamlı serum proteomlarının accession numaraları, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına göre dağılımları

Tablo 25: Kontrol ve tedavi sonrası hasta grubunda ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren serum proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları

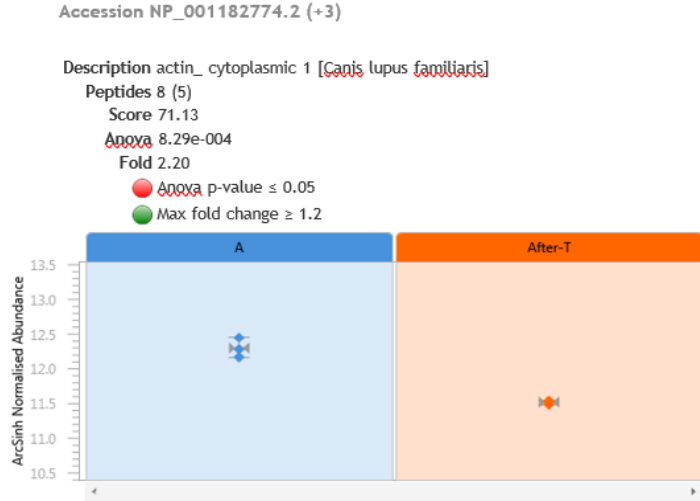
Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Tags	Description	Average Normalised Abundances	
							A	After-T
XP_005628024.1	82 (13)	754.17	0.05	3.53		serum albumin isoform X1 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	2.41e+005	6.83e+004
NP_001003026.1	72 (3)	745.80	0.05	3.53		serum albumin precursor [<i>Canis lupus familiaris</i>]	3.49e+004	9882.02
XP_536110.2	55 (52)	430.61	0.03	1.87		complement factor H [<i>Canis lupus familiaris</i>]	3.96e+004	2.12e+004
XP_022266304.1	18 (2)	216.29	0.03	2.69		immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	3855.45	1434.56
XP_005633270.2	30 (30)	211.90	3.66e-003	1.77		complement C3 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	1.28e+004	2.26e+004
XP_005618890.1	14 (13)	108.15	0.04	2.58		angiotensinogen [<i>Canis lupus familiaris</i>]	1.05e+005	4.06e+004
XP_535835.2	10 (10)	84.87	0.01	2.19		fetuin-B [<i>Canis lupus familiaris</i>]	3.08e+004	1.41e+004
NP_001182774.2	8 (5)	71.13	8.29e-004	2.20		actin_cytoplasmic 1 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	1.11e+005	5.03e+004
XP_534989.4	6 (6)	61.38	0.04	2.12		carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1 [<i>Canis lupus familiaris</i>]	2219.82	4696.74



Şekil 69: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda carboxypeptidase N catalytic chain isoform düzeyindeki değişim



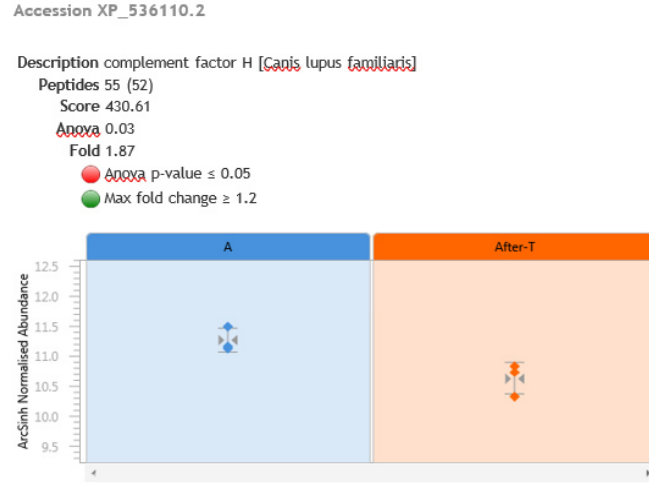
Şekil 70: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda complement C3 düzeyindeki değişim



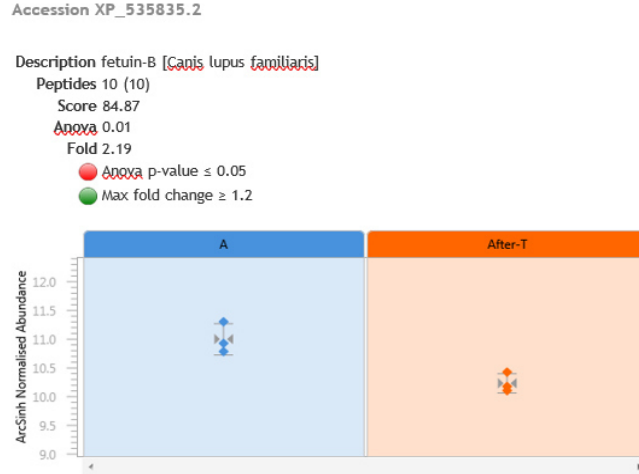
Şekil 71: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda actin cytoplasmic 1 düzeyindeki değişim



Şekil 72: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda angiotensinogen düzeyindeki değişim



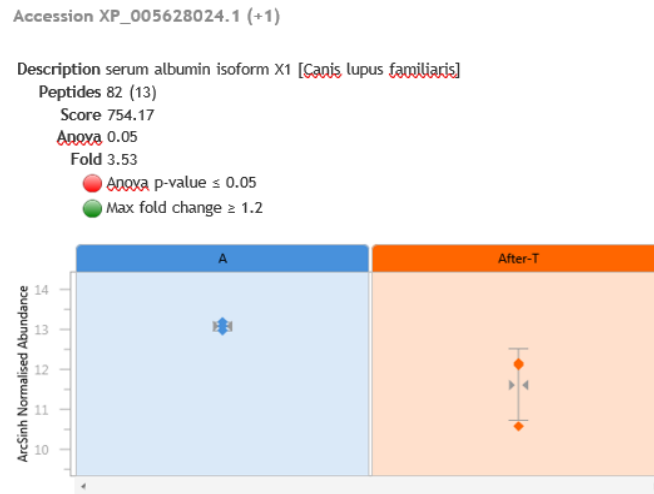
Şekil 73: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda complement factor H düzeyindeki değişim



Şekil 74: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda fetuin-B düzeyindeki değişim



Şekil 75: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda immunoglobulin lambda-1 light chain düzeyindeki değişim



Şekil 76: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda serum albumin isoform düzeyindeki değişim

Accession NP_001003026.1

Description serum albumin precursor [Çanıs lupus familiaris]

Peptides 72 (3)

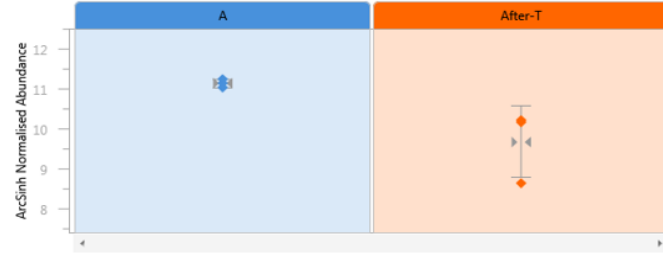
Score 745.80

ANOVA 0.05

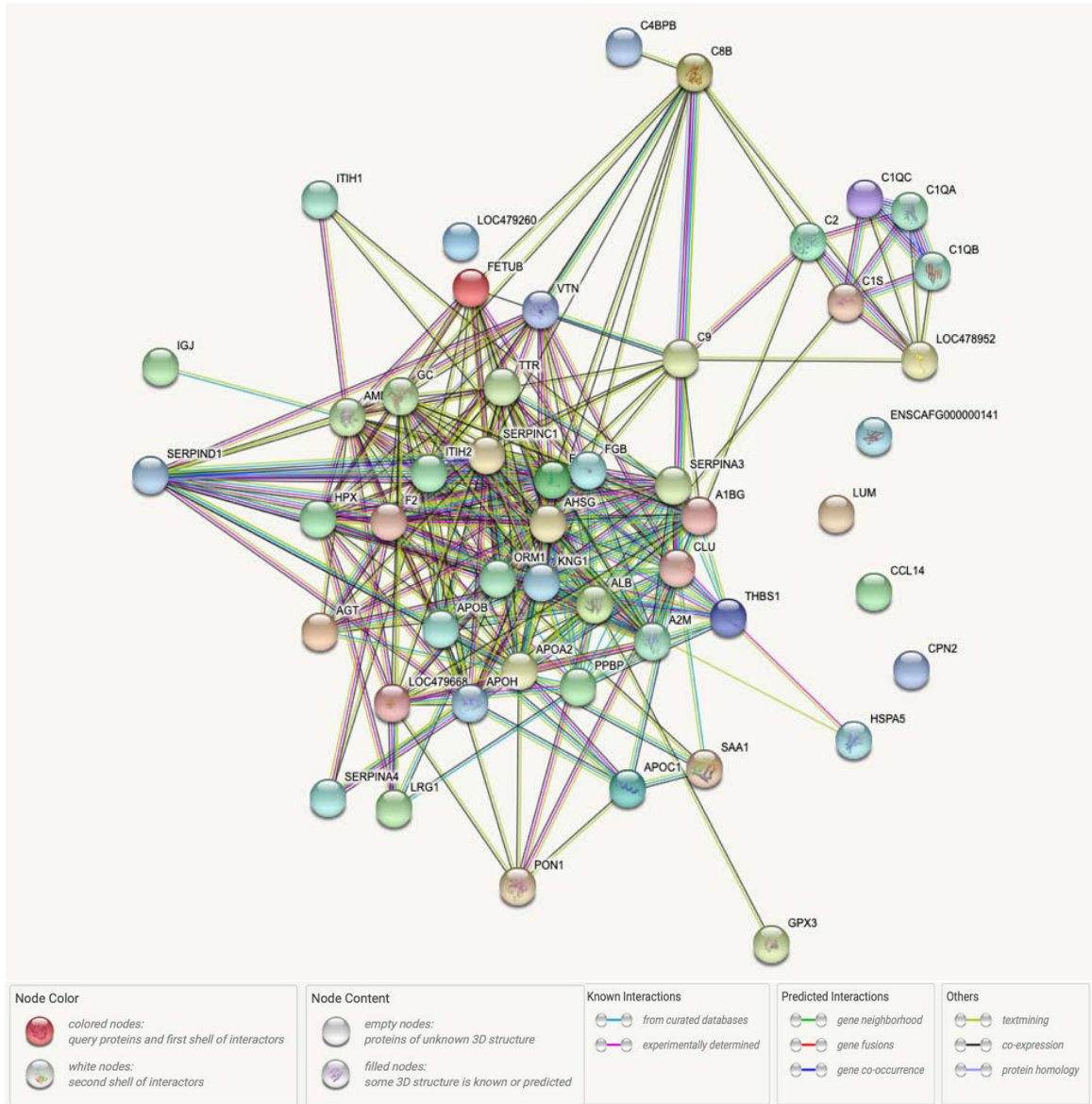
Fold 3.53

● ANOVA p-value ≤ 0.05

● Max fold change ≥ 1.2



Şekil 77: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda serum albumin precursor düzeyindeki değişim



Şekil 78: Bu çalışmada canis lupus familiaris protein veri bankasına göre tanımlanan tüm proteinler ve bu proteinlerin birbiri ile olan ilişkisi. Komplement sistemin kendi arasında (C1, C2 ve C4), fetuin (FETUB), serpin ve hemopeksinin (HPX) diğer proteinlerle olan ilişkisi dikkat çekicidir (www.string-db ile oluşturulmuştur).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Köpeklerde kalp yetmezliğinin tanımlanmasında klinik süreç, görsel tanısal unsurlar (EKG, radyoloji, MR ve CT), serum biyobelirteçleri (cTnI ve NT-Pro-BNP vb.) ve ekokardiyografi temelli çalışmalar olmasına rağmen (Schober et al., 2010), insan ve veteriner hekimliğinde serum sitokin paneli, oksidatif stres seviyesi ve proteomların kalp yetmezliği tanı ve sınıflandırılması için kullanılabilirliğini ortaya koyacak bilgiler eksik kalmıştır. Bu çalışmada öncelikli olarak ACVIM'e göre kalp yetmezliği tanımlanan köpeklerde sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında serum sitokin paneli ve proteomlarında meydana gelen değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır; bu değişimlerin kalp yetmezliği tanı ve patofizyolojik mekanizmalarının detaylandırılmasına verebileceği olası katkılar ele alınmıştır. Ayrıca, semptomatik hastalarda tedavi öncesi ve sonrası yapılan analizlerle; incelenen parametrelerin tedavi izlenebilirliğine katkıları da değerlendirilmiştir. Köpeklerdeki kalp yetmezliğinin insanlar için bir model olduğu düşünüldüğünde; bu çalışma sonuçları “tek sağlık” konseptine de katkı sağlayabilir görülmektedir (Hasenfuss, 1998).

5.1. Kalp Yetmezliği ve Klinik Süreç:

Kalp yetmezliği ACVIM'e göre asemptomatik (A ve B sınıfları) ve semptomatik olgulardan (C ve D sınıfları) oluşmaktadır. A sınıfında bulunan hastalar herhangi bir kalp hastalığı olmamakla birlikte kalp hastalıklarına predispoze ırkları temsil etmektedirler (Keene et al., 2019). Kalp yetmezliği insanlarda olduğu gibi köpeklerde de yaygın olarak MMVD ve DCM'ye bağlı olarak meydana gelmektedir (Reimann et al., 2017, Broschk, & Distl, 2005). Bedensel olarak küçük ırkların MMVD'ye, büyük ırkların da DCM'ye predispoze oldukları bilindiğinden (Broschk ve Distl, 2005; Borgarelli et al., 2006) bu çalışmanın materyali literatüre uygun olarak (Reimann et al., 2017, Ghiassi, Shirani, Veshkiniand, & Bahonar, 2019) farklı ırktaki köpeklerden oluşturulmuştur. Bu çalışmada her ne kadar cinsiyet farklılıklarına göre hedef ölçümlerin

yapılması planlanmamış olsa da; materyalimizi oluştururken köpeklerin semptomatik olanlarında erkeklerin dişilere göre daha fazla olduğu dikkati çekmiş, bu yönüyle çalışmamız MMVD (Pankov, 2018) ve DCM ile ilgili (Broschk, & Distl, 2005; Borgarelli et al., 2006) diğer araştırmacıların önceki çalışma bulgularına paralellik göstermiştir. Pankov (2018) MMVD’li köpeklerde cinsiyet faktörünün hastalığın progresyonunda önemli olabileceğini ve erkeklerde dişilere göre özellikle sol ventriküler değişimlerin daha belirgin olduğunu bildirmiştir.

ACVIM sınıflandırmasına göre bu çalışmaya dahil edilen köpeklerde A ve B2 sınıflarında herhangi bir klinik şikayet not edilmezken, C ve D sınıflarında literatür (Keene et al., 2019) ve klasik kitap (Ware, 2011) bilgileri ile uyumlu olarak anamnez temelinde egzersiz intoleransı, kronik öksürük ve kilo kaybı, fiziksel muayene bulgularında da değişen derecelerde mitral kapak lokalizasyonunda sistolik üfürümler, kardiyak ritim bozuklukları (sinüs taşikardi, atriyal fibrilasyon vb.) ve abdominal genişleme (ascites) tespit edilmiştir. MMVD’ye bağlı olarak sol atriyumda preload (ön yük) artışı pulmoner venlerde genişlemeye ve pulmoner ödeme yol açmaktadır. Bu durum ventriküler preload artışını tetikleyerek; sentral venöz basınç artışı ve bu çalışmanın bazı olgularında görüldüğü gibi juguler dolgunluk, plevral efüzyon ve asites ile sonuçlanmaktadır (Chatterjee, & Rame, 2008; Ware, 2011). Çalışmamızda D sınıfı olgularda tespit edilen kilo kaybının kardiyak kaşeksiye bağlı olarak iskelet kas kitlesindeki azalmadan, kardiyak kaşeksinin de sistemik inflamasyon ve intestinal hipoperfüzyondan ileri gelebileceği düşünülmüştür (Boswood et al., 2020). Bununla birlikte KKY’li köpeklerde gelişen iştahsızlık ve buna bağlı kalori alımının azalması da kilo kaybını arttıran unsurlar olarak dikkati çekmektedir (Boswood et al., 2020).

Çalışmaya katılan kontrol ve test grubundaki köpeklerin yaş ve canlı ağırlıklarının minimum ve maksimum değerleri arasında farklılıklar olsa da ortalamalarında istatistiksel bir değişim gözlenmemiştir. Bu çalışmaya benzer olarak Li et al. (2019) da 7.9-13.7 yaş aralığında olan pre-klinik aşama MMVD’li köpeklerde çalışma yapmışlardır. Ghiassi et al. (2019) yaptıkları çalışmada 37 adet MMVD’li köpeğin yaş aralığını 4-13 yaş olarak aktarmışlardır. Seo et al. (2020) konjestif kalp yetmezliği tanımladıkları köpeklerin yaş

aralığını 7.9-13.7 yıl olarak rapor etmişlerdir. Son yapılan bir çalışmada (Mikawa et al., 2020) MMVD'ye bağlı KKY'liği gelişen köpeklerin yaş ortalamaları B2 sınıfı için 10.8 yaş (7.0-15.2 yıl), C ve D sınıfları için de 12.4 yaş (8.6-14.2 yıl) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda yaş aralıklarındaki bu farklılıklar kalp yetmezliğinin orta ve ileri yaşlı köpeklerde önemli bir sağlık problemi oluşturduğunu da ortaya koymaktadır.

Kalp ve solunum sayılarının kontrol grubu (A sınıfı) ile karşılaştırıldığında test grubunu oluşturan KKY'li gruplarda (B2, C ve D sınıfları) kademeli bir artış göstermesi kalp yetmezlikli köpeklerde klinik bulguların aktarıldığı çalışma verileri ile (Boswood et al., 2020) uyumlu görülmüş; bu değişimler artan metabolik ihtiyaçların karşılanmasına yönelik olarak hastalardaki nöro-humoral mekanizmaların aktive edilmesine bağlanmıştır. Bu bulgularımıza paralel olarak, Boswood et al. (2020) MMVD'li olup ACVIM kalsifikasyonuna göre B2 şiddetinde kalp yetmezliği tanımladıkları köpekleri pre-klinik süreçten konjestif kalp yetmezliğine aşamasına kadar takip etmişler; solunum sayısı (klinikte ve evde), kalp frekansı ve VHS parametrelerinin kalp yetmezliği şekillendiğinde önemli düzeyde arttığını, benden sıcaklığı ve canlı ağırlığın ise azaldığını belgelemişlerdir. Radyografik muayenede köpeklerde MMVD ile ilgili olarak sol atriyal büyüme ve ana bronşların dorsale deviasyonunun en önemli ve yaygın iki bulgu olduğu belirtilirken (Ghiassi et al., 2019), bu çalışmamızda radiografik kompozit skoru (Schober et al., 2010) kullanılmış ve yeterli skora sahip (>4; konjestif kalp yetmezliği olma olasılığı kuvvetle muhtemel) olanlar KKY tanımlaması ile çalışmaya dahil edilmişlerdir. Bu bulgular klinik süreçte hastaların mutlaka EKG ve ekokardiyografi ile kardiyolojik değerlendirilmeye alınması için önemli tespitler olarak kabul edilmiştir.

Kalp frekansı D sınıfı hastalar için hem sağlıklı (A sınıfı) hem de B2 grubu hastalara göre istatistiksel düzeyde anlamlı değişim göstermiştir. Bu artışın mitral regürgitasyonun şiddetlenmesine bağlı azalan stroke volüme (her bir kalp atımında pompalanan kan miktarı) yanıt olarak sempatik ton artışına bağlı olduğu düşünülmüştür (Boswood et al., 2020). Beden sıcaklığında konjestif kalp yetmezliği geliştiğinde bozulan periferik dolaşım yetmezliğine bağlı olarak azalma olabileceği ifade edilmesine rağmen

çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel anlamda bir fark oluşmamıştır (Boswood et al., 2020). Bu durum çalışmamıza dahil ettiğimiz semptomatik hastalarda özellikle D sınıfı köpeklerde tedavi ile birlikte dolaşımın makul seviyelerde tutulabildiğinin bir göstergesi olarak düşünülmüştür. Kaldı ki ekokardiyografik ölçümlerde miyokardiyal kasılma indikatörleri olan EF ve FS değerlerinin D sınıfı hastalarda diğer gruplara göre daha düşük olmakla birlikte istatistiksel düzeyde anlamlı değişim göstermemesi de bu tespitlerimizi destekler niteliktedir. Bu çalışmada semptomatik hastalardaki VHS artışı; radyolojik olarak kalp boyutlarındaki artışın bir göstergesi olup mitral kapaktaki miksamatoz değişimlerin şiddetlenmesi ve buna bağlı olarak kardiyak dilatasyon yaratacak şekilde mitral regürjitasyon derecesinin ve sol ventriküler volüm yükünün artması ile ilişkilendirilmiştir (Boswood et al., 2020).

İdiopatik DCM ile ilgili köpeklerde yapılan çalışmalarda (Borgarelli et al., 2006; Soares et al., 2010) ortalama SAP değeri referans değerlerde belirlenirken, benzer şekilde Mishina et al. (1997) da köpeklerde SAP, DAP ve MAP değerlerinin sağlıklı kontrol ve kalp hastalığı olanlarda istatistiksel anlamlı farklılık göstermediğini rapor etmişlerdir. Bu ve diğer çalışmalara (Li, Heaney, Langefeld-McCoy, Boler, & Laflamme, 2019) paralel olarak bizim çalışmamızda B2 sınıfı hastalarda non-invazif kan basınç ölçümü ile SAP ve DAP değerinde sağlıklı kontrollere göre istatistiksel anlamda bir fark bulunamamıştır; ancak, C sınıfı hastalardaki SAP değeri ortalama (154 ± 19 mmHg) ve üst sınır olarak (206 mmHg) hipertansiyon eğilimini, bazı olgularda ise varlığını göstermiştir. Bununla birlikte KKY'li köpeklerde B2, C ve D sınıfı hastalarda non-invazif tansiyon ölçüm değerinde gözlenen bu varyasyonlarda nöro-humoral adaptasyon mekanizmalarının (sempatik ton artışı) aktive olması kadar beyaz önlük sendromu, çevresel hareketlilik ve/veya ölçümler sırasında hastalardaki olası stresin de etkili olabileceği düşünülmüştür (Li et al., 2019). Bu tespitler KKY'de nöro-humoral düzenleyici mekanizmaların aktive edildiğinin klinik göstergeleri olurken (Ware, 2011), tedavi aşamasında anti-hipertansif ilaçların kullanım gerekliliğine de bir alt yapı oluşturmuştur (Oyama, Peddle, Reynolds, & Singletary 2011). Bu düşüncelere paralel olarak C sınıfı hastalarda uygulanan tedavi ile (inadilatör, ACE-i, diüretik vb.) klinik parametrelerin bazılarında (kalp ve solunum sayıları) önemli değişim

olmazken, diğ er parametrelerde (SAP, DAP ve MAP) istatistiksel olarak azalma belirlenmesi iyileş me sürecinin klinik göstergeleri olmuştur.

Kardiyolojik muayene ş eması içinde insanlarda oldu ğ u gibi veteriner hekimliğinde de EKG den yararlanılmaktadır. Klinik muayene sürecinde kalp oskultasyonu ile tespit edilen taş iaritmilerin doğrulanması ve bu aritmilerin orjininin (atrial veya ventriküler) belirlenmesi adına EKG muayenesine baş vurulmaktadır (Dukes-McEwan, Borgarelli, Tidholm, Vollmar, & H äggström, 2003). Bu çalış mada hastaların EKG incelenmesi sırasında ritim analizleri yapılmış ; kontrol (A sınıfı) ve asemptomatik test grubunda (B2 sınıfı) bulunan köpeklerin tümünde sinus ritim, bazılarında da respiratorik sinus aritmi belirlenmiştir. Semptomatik test sınıflarında; sinus taş iaritmi ve atriyal fibrilasyon ile birlikte atriyal ve ventriküler prematür kompleksler belirlenmiştir. Bu yönü ile EKG bulgularımız MMVD (Crosara et al., 2010) ve DCM'li köpek çalış ma (Pereira et al., 2008; Dukes-McEwan et al., 2003) bulgularına paralellik göstermiştir. Ritim değerlendirmesine ek olarak morfolojik değerlendirmeler de yapılmış ; sol atriyal dilatasyon (P-mitrale), sağ atriyal dilatasyon (P-pulmonale), sol ventriküler büyüme (R amplitüdünde artma) ve sağ veya sol aksis deviasyonu bulgularına ulaşılmıştır. EKG'nin kalpte meydana gelen morfolojik de ğ iş imleri ortaya koyma potansiyeli sınırlı olarak görülmekle birlikte Pereira, Woolley, Culshaw, French, & Martin (2004) yaptıkları çalış ma ile; R amplitüdünde artma, QRS süresinde uzama ve derin Q dalgalarının kardiyomyopati için iyi bir indikatör olabileceğini belirtmiş lerdir. Bu tespitler klinik süreçte EKG muayenesinin önemini bir kez daha göstermiş , hastaların detay kardiyolojik incelemeye alınma gerekliliğini de ortaya çıkartmıştır.

Ekokardiyografi kalp hastalıklarının tanımlamasında günümüzde altın standart olarak kabul edilmektedir (Ware, 2011). Bu çalış mamızda farklı görüntüleme pencerelerinde (sağ parasternal, sol apikal ve sub-kostal) rutin ekokardiyografik muayene teknikleri (2D, M-mode, renkli Doppler ve CW/PW Doppler) uygulanarak kalp boşluklarının (atriyum ve ventriküller) ve damarlarının (aort, pulmoner arter ve pulmoner venler) morfolojik de ğ erlendirilmesi yapılmış , damar ve kalp

kapakçıklarındaki (mitral ve trikuspid kapaklar) akım karakteristikleri de belirlenmiştir. Bu incelemeler sırasında hastalardan bir çok veri elde edilmesine rağmen çalışma amaçları doğrultusunda ACVIM kalsifikasyonuna olanak sağlayacak olanlara öncelik verilmiştir. Bu yaklaşımla klinik bulguların yanısıra radyolojik ve ekokardiyografik ölçümleri de normal çıkan köpekler A sınıfını (VHS < 10.5, LA/Ao: < 1.6 ve LVIDDn < 1.7), mitral kapakta hafif-orta düzeyde üfürümü ve kardiyomegalisi (VHS > 10.5 ve LA/Ao: > 1.6) olan olgular da literatürle uyumlu bir şekilde (Keene et al., 2019) B2 sınıfını oluşturmuşlardır. Semptomatik hasta gruplarında öncelikle sol kalp boşluklarında (sol atriyum ve sol ventrikül) A ve B2 sınıfı hastalara göre LA/Ao ve LVIDDn değerlerinde istatistiksel düzeyde artışlar saptanması; C ve D sınıflarında kardiyak morfolojik şekil değişiminin (cardiac remodeling) varlığını ve şiddetini yansıtmıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da pre-klinik MMVD'li köpeklerin (ACVIM'e göre B2 sınıfı hastaların) tanımlanmasında, çalışmamıza benzer şekilde radyolojik (VHS > 10.5) ve ekokardiyografik ölçümlerden (LA/Ao: \geq 1.6 ve LVIDDn \geq 1.7) faydalanılmıştır (Boswood et al., 2020; Sarcinella et al., 2019; Osuga et al., 2015). Her ne kadar Dukes-McEwan et al. (2003) DCM tanımlaması için ekokardiyografi temelli bir skorlandırma sistemi önermiş olsalar da Adin et al. (2019) DCM'li köpekleri çalışmalarına dahil edebilmek için kriter olarak; bizim çalışmamıza benzer şekilde sol ventrikül FS (\leq %25) ve LVIDDn değerlerini (\geq 1.8) yeterli görmüşlerdir. Çalışmamızda KKY'li hastaların MMVD ve DCM'li olgulardan seçilmesi; ekokardiyografik değerlendirmelerde öncelikli morfolojik değişimlerin LA ve LV çaplarında meydana gelmesinin de açıklamasını oluşturmuştur. M-mode ile ölçülen EPSS değerinde D sınıfı hastalardaki istatistiksel düzeydeki yükselme; LV dilatasyonunun ve sol kalp yeniden şekillenmesinin bir diğer göstergesi olmuştur (Holler, & Wess, 2014). Bu bulgu ve yorumlarımız bir önceki çalışmamızda (Kocatürk ve diğerleri, 2016) DCM'li köpeklerde sol kalp boşluklarında büyüme ve EPSS değerlerinde elde ettiğimiz değişimlerle paralellik göstermiştir.

Ekokardiyografik olarak FS ve EF değerleri ile miyokardiyal kontraktilite kabiliyeti (sistolik fonksiyon) değerlendirilirken, kalbin diyastolik fonksiyonları da mitral akım karakteristiği (E/A oranı) ile ortaya konmaktadır. Bu alışmada DCM’li olgularda kalp hastalığı şiddetlendikçe FS değeri azalırken, MMVD’li olgularda önemli bir değişim olmaması; DCM ve MMVD’nin patofizyolojisi ile uyumlu görülmüştür (Ware, 2011; Duker-McEwan et al., 2003). Mitral ve trikuspid E/A oranları kontrol grubu (A sınıfı) ile karşılaştırıldığında B2 ve C sınıflarında istatistiksel düzeyde önemsiz ancak D sınıfında önemli düzeyde artış göstermiştir. Bu değişim D sınıfı hastalarda diyastolik fonksiyon bozulmasının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Smith, Tilley, & Oyama 2016). Mitral akım profili birçok faktör tarafından belirlenen kompleks bir oluşumdur ve bu oluşumda; sol atriyal basınç, relaksasyon, LV sistolik basınç, ventriküler suction (emiş gücü), preload (n yk), kalp frekansı ve atriyal fonksiyonun rol oynadığı unutulmamalıdır (Boon, 2011). Kalp yetmezlikli köpeklerde erken LV disfonksiyon göstergesi olarak transmitral akımda gecikmiş relaksasyon (pik E velositesi yüksek, deselerasyon süresi uzun >160 ms, pik A velositesi düşük ve E/A: <1) tespit edilirken (Schober et al., 2010), ileri dönem kalp yetmezliğinde LV dolum basıncı artışına bağlı olarak “psydonormal” ya da bu alışmamızda D sınıfı hastalarda olduğu gibi “restriktif” transmitral akımlar (mitral E/A>2) görülebilmektedir (Schober et al., 2010).

Çalışmamıza dahil edilen olgularda MMVD’nin bir komplikasyonu olarak pulmoner arter velositelerinde (PAVmax) her hangi bir artış saptanmamış, böylece pulmoner hipertansiyon tespiti söz konusu olmamıştır (Borgarelli et al., 2015). Aort ejeksiyon süresi (Ao-ET) D sınıfı hastalarda diğerlerine göre daha kısa not edilmiş; bu değişim kalpte şekillenen taşikardi ile ilişkilendirilmiştir. Ao-ET lcm; kalpte sistolik fonksiyonların değerlendirilmesinde kullanılan önemli parametrelerden biridir (Boon, 2011). Bu alışmada Ao-ET sresindeki azalma eğilimi kardiyak debi için gerekli zamanı kısaltıp LV’de diyastol sonu basıncı artırarak geometrik ve fonksiyonel değişimlere yol açmış (Little, Kitzman, & Cheng 2000) olabilir.

5.2. Kalp Yetmezliği ve Hemogram:

Günümüzde insanlarda olduğu gibi köpeklerde de sistemik inflamasyon (SIRS) ve konjestif kalp yetmezliği arasında güçlü bağlardan bahsedilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada kalp yetmezlikli olgularda inflamatuvar süreci irdeleyebilmek için tam kan sayımı ile birlikte serumda yangısal sitokinlerin ve akut faz proteinlerin (APPs) ölçümü de gerçekleştirilmiştir.

Lökogram verilerindeki değişimler yangısal cevabın ortaya konmasında klinik süreçte yaygın kullanılan parametrelerdir (Willard, & Tvedten, 2012). Bu çalışmada ortalama WBC ve nötrofil sayılarının semptomatik hastalarda (C ve D sınıfları) asemptomatik (B2 sınıfı) ve sağlıklı kontrollere göre (A sınıfı) istatistiksel olarak yüksek belirlenmesi; stress lökogram ve/veya SIRS'ın varlığını düşündürmüştür. Stres lökogram; nötrofilik lökositosisle birlikte lenfopeni, eozinopeni, monositosis ve/veya bazofili ile karakterize edilmektedir (Willard, & Tvedten, 2012). Bu çalışmada D sınıfı hastalarda lenfosit sayısının 500-3.100/ μ L aralığında belirlenmesi; bazı olgularda lenfopeni nedeni ile stres faktörünün de etkili olabileceğini düşündürmüştür. Semptomatik hastalarda elde ettiğimiz nötrofilik lökositosis değerlerinin diğer araştırmadaki (Paltrinieri, Sartorelli, Vecchi, & Agnes, 1998) şiddetli kalp yetmezlikli köpeklerdeki verilere benzerlik göstermesi; bu değişimlerin SIRS ile ilgili olabileceği yaklaşımını güçlendirmiştir.

İnsanlarda kalp hastalıklarında eritrogram değişimlerini irdeleyen çalışmalar da söz konusudur (Paltrinieri et al., 1998). Bu çalışmada eritrogram değerlerinde gruplar arasında istatistiksel düzeyde değişim gösteren tek parametre Hct olmuştur. D sınıfı hastalarda diğer gruplara göre ortalama Hct değeri düşük olmakla birlikte referans sınırlarda bulunmuş; ancak, minimum değerleri itibariyle de bazı olgulardaki anemi eğilimi dikkati çekmiştir. Bu durum D sınıfı hastalardaki yaş faktörü ile birlikte kronik organ/doku hastalıklarına (KKY gibi) bağlı olarak kan yapımının azalması ile ilişkilendirilmiştir. Bu yönü ile çalışma bulgularımız Prihirunkit et al. (2014)'ın MMVD'li olup konjestif kalp yetmezliği gelişen köpeklerde tespit ettikleri yüksek ve istatistiksel anlamlı Hct değişimlerine tezat oluşturmuştur.

Bu çalışmada eritrosit indeksi ile ilgili parametrelerde gruplar arasında istatistiksel önemde bir değişim saptanamamıştır. Bu bulgumuza benzer olarak CVHD'si olan köpeklerde yapılan bir çalışmada; eritrosit RDW değerinin sağlıklı kontrollere göre önemli değişim göstermediği, kalp yetmezliği gelişen ve gelişmeyen olgular arasında da istatistiksel bir fark oluşmadığı rapor edilmiştir (Guglielmini et al., 2013). Aynı çalışmada (Guglielmini et al., 2013) RDW'nin CVHD'nin şiddeti ile ilgili LA/Ao oranı ile anlamlı ancak zayıf pozitif korelasyonu da ifade edilmiştir. Son yıllarda kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkması ve kötü prognoz tespitinde RDW artışının öneminden bahsedilmektedir (Groenveld et al., 2008; Tang, & Katz, 2006).

İnsanlarda kalp yetmezliklerinde ve özellikle kedilerde HCM'de platelet aktivasyonu ve bununla ilgili komplikasyonlara (tromboembolizm) sıklıkla rastlanmaktadır (Ware, 2011). Bu nedenle bu çalışmada da platelet sayısı ve indeksleri (PCT, MPV ve PDW) kayıt altına alınmış; hasta gruplarında (B2, C ve D sınıfları) sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir değişim olmamakla birlikte değerlerin referans sınırlarda olduğu gözlenmiştir (Willard, & Tvedten, 2012). Benzer şekilde son yıllarda yapılan çalışmalarda da (Prihirunkit et al., 2014; Levent ve diğerleri, 2020) MMVD'li olup konjestif kalp yetmezliği gelişen köpeklerde platelet sayılarının kontrollere göre önemli bir fark göstermediği ve referans sınırlarda kaldıkları belirlenmiştir. Levent ve diğerleri (2020) ACVIM klasifikasyonuna göre C sınıfı kalp yetmezliği belirledikleri köpeklerde platelet proteinlerini incelemişler; 10 anlamlı değişim gösteren protein temelinde, bu hücrelerin kalp yetmezliği patofizyolojisindeki güçlü potansiyellerini ortaya koymuşlardır.

5.3. Kalp Yetmezliği ve Organ - Doku Hasar Belirteçleri:

Kalp yetmezliği doku ve sistemlerde hasarlanma ve yetersizliklere yol açabilmektedir (Ware, 2011). Bu nedenle hastaların sadece klinik ve görüntülü tanı teknikleri ile değerlendirilmesi, kalp yetmezliği ile ilgili multi-organ hasarlarının gözden kaçmasına ve tedavi etkinliğinin azalmasına neden olabilir. Bu kapsamda bu çalışmada kalp yetmezlikli köpeklerde rutin biyokimyasal profil irdelenmiş; kalp, böbrekler, karaciğer, tiroid ve vitamin dengesi ortaya konmuştur.

Küçük hayvan ve insan hekimliğinde hastalıkların tanısında spesifik doku hasarını gösteren biyobelirteçlere ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Langhorn, & Willesen, 2015). Kalp hastalıkları ile ilgili geçmişte bazı enzim aktiviteleri (AST, LDH ve CK-MB) kullanılmışken, günümüzde kardiyak troponinler (cTnI) ve natriüretik peptidler (NT-pro-BNP) öncelik almıştır (Bakirel, & Gunes, 2009; Çakıroğlu ve diğerleri, 2009; Porciello et al., 2008). Serum cTnI ve NT-pro-BNP'nin sadece kalp kası ve ventrikül fonksiyon bozukluklarında değil başta renal problemler olmak üzere diğer hastalıklarda da yükselbilir düzeyde bulunması bilimsel çalışma ve pratik koşullarda bazen dezavantajlara neden olmaktadır (Langhorn, & Willesen, 2015; Porciello et al., 2008; Ware, 2011). Bu nedenle bu çalışmada miyokardiyal hasar belirteci olarak serumda cTnI çalışılmış; azotemi nedenli yükselmeleri ortaya koymak için de renal fonksiyon parametreleri (BUN ve Cr) belirlenmiştir. Bu çalışmada serum cTnI ortalama değerinin C ($1.8 \pm 1,3$ ng/mL) ve D sınıflarında ($7.0 \pm 12,2$ ng/mL) kontrol (0.03 ± 0.04 ng/mL) ve B2 gruplarına göre (0.03 ± 0.04 ng/mL) daha yüksek bulunması; semptomatik hasta gruplarında miyokardiyal hasarın varlığı ve şiddetini ortaya koymuştur (Oyama, & Sisson, 2004).

Kalp yetmezliğinde özellikle sistolik fonksiyon bozukluğunda (ileri atım yetmezliğinde) kardiyorenal sendrom olarak tanımlanan ve renal hipoperfüzyon ile karakterize komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Brewer et al., 2012; Pouchelon et al., 2015). Bu çalışmada kalp yetmezliği tanımladığımız köpeklerde kardiyorenal sendrom varlığını belirlemek adına serumda renal fonksiyon biyobelirteçleri (BUN ve Cr) değerlendirilmiş; ancak, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında ortalama değerlerde anlamlı değişimler oluşmamıştır. İstatistiksel düzeyde önemin oluşmamasında özellikle semptomatik hasta verilerinde geniş bir varyasyon olması da etkin olmuştur. C ve D sınıfı hastalarda BUN değerlerinin maksimum 52 mg/dL ve 89 mg/dL (sırasıyla) belirlenmesi; kalp yetmezliğine bağlı pre-renal azotemi eğilimini ortaya koymuştur. D sınıfı hastalardaki maksimum BUN değerlerinde refraktör kalp yetmezliği nedeni ile sık ve yüksek dozlarda diüretik (furosemid) kullanımı da etkin olabilir. Bu sınıfı hastalardaki serum Na düzeyindeki azalma eğilimi; diüretik kullanımına bağlı yan etkileri de (elektrolit kaybı) ortaya koymaktadır.

Kalp yetmezliğinde renal fonksiyonların yanısıra, karaciğer de olumsuz etkilenebilmektedir (Alvarez, & Mukherjee, 2011). Bu çalışmada serum karaciğer enzim düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel önemde farklılıklar belirlenememiştir. Bunun olası nedeni D sınıfı hastalarda ortalama serum ALT ve ALP düzeyleri kontrole göre daha yüksek olmasına rağmen standart hataların çok yüksek olması olarak düşünülmüştür. Serum ALT ve ALP'nin maksimum değerlerinin C ve D sınıfı bazı hastalarda çok yüksek belirlenmesi; kalp yetmezliğine bağlı değişen derecelerde hepatosit hasarını düşündürmüştür. Kalp yetmezliklerinde serum karaciğer enzim aktivitelerindeki artışın olası nedenleri olarak düşük kalp debisi ve/veya dolum basıncının artması sonucu pasif konjesyon gelişmesi ve hepatik perfüzyonun bozulması gösterilmektedir (Alvarez, & Mukherjee, 2011). Kedi ve köpeklerde CVHD ve kardiyomyopati nedenli konjestif kalp yetmezliğinde olguların %52'inde serum BUN artışı, %26'sında da karaciğer enzim aktivitelerinde yükselme belirlenmesi (Goutal, Keir, Kenney, Rush, & Freeman, 2010), çalışma sonuçlarımızla kısmen uyumlu görülmektedir. Alvarez, & Mukherjee (2011) karaciğer etkilenmesine bağlı olarak serum bilirubin düzeyinin de artabileceğini (hiperbilirubinemi) ve total bilirubin düzeyinin 3 mg/dL'den daha yüksek olabileceğini ifade etmişlerdir. İnsanlarda kalp yetmezliğinde serum albüminde azalma, globülinle birlikte total protein düzeylerin de artma rapor edilmesi; adı geçen parametrelerin köpeklerde de kalp hastalıklarının tanı ve monitorizasyonunda takip edilmesinin önemini göstermektedir. Serum total protein ve globülin düzeylerinin artması, kalp hastalığına eşlik eden inflamatuvar yanıtların ortaya çıkarılmasında katkı sağlayabilir görülmektedir (Verma et al., 2016).

İnsanlarda kalp hastalıkları ve glukoz metabolizması arasında önemli bağlantılardan bahsedilmektedir. Konjestif kalp yetmezliği olanlarda tip 2 diabetes mellitus görülme olasılığının arttığı ifade edilmektedir. Bu gelişimde; fiziksel aktivite kaybı, hipermetabolik durum, intrasellüler metabolik defektler, zayıf kas perfüzyonu ve kötü beslenmenin rol aldığı bildirilmektedir. Konjestif kalp yetmezliğinde sempatik aktivasyon nedeni ile insülin rezistansı artarken insülinin pankreatik beta hücrelerden salınımı da azalmaktadır (Tenenbaum, & Fisman, 2004). Bu çalışmada serum glukoz düzeylerinde kontrole göre test grubunda önemli bir değişim

saptanamamıştır. Konjestif kalp yetmezlikli köpeklerde yapılan bir çalışmada (Goutal et al., 2010) %27 oranında hiperglisemi saptanmış, diğer çalışmada da (Brady, Hughes, & Drobotz 2004) tedavi verilmeden önce yapılan örneklemelerde hiponatremi ve referans değerlerin üstünde serum glukoz değerleri tespit edilmiştir. Bu değişimlerin tedavi etkinliği ve prognozu olumsuz etkilediği vurgulanmıştır (Brady et al., 2004). Bu bilgiler insanlarda olduğu gibi köpeklerde de kalp yetmezliği ve diabetes mellitus gelişim riskini araştıran materyal sayısı daha yüksek çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir. Eurich et al. (2009)'ın köpeklerde metformin tedavisi ile kalp yetmezliği progresyonunun yavaşlatılabileceğini ileri sürmeleri bu konuya farklı bir bakış açısı getirmiştir.

Kalp yetmezliğinde zayıf doku perfüzyonuna bağlı olarak pankreatitis gelişimini bildiren bazı çalışmalar olmasına (Jiang et al., 2002) rağmen bu çalışmada ACVIM kalsifikasyonuna göre "C ve D sınıfı" kalp yetmezliği tanımladığımız köpeklerde serum amilaz değerlerinde kontrollere göre anlamlı bir değişim saptanamamıştır. Serum amilaz ölçümlerinin pankreatitis varlığını ortaya koymak için sensitivite ve spesifitesinin düşük olduğu, bu nedenle öncelikli olarak köpeklere spesifik lipase'nin ölçülmesi önerilmektedir (Willard, & Tvedten, 2012). Serum amilaz ve lipaz değerlerinin normal değerlerden en az 3 kat artması ile birlikte klinik uyum olduğunda pankreatitis tanısına gidilmesi tavsiye edilmiştir (Jiang et al., 2002). Hem sağlıklı hem de test grubunda serum amilaz değerleri referans sınırlar içinde kalmış, test grubunda olası bir pankreatit varlığını destekleyen her hangi bir bulgu söz konusu olmamıştır.

Tiroid fonksiyonları kalp hastalıklarının altyapısında önemli bir yer tutmakta, yetersizlik durumunda LV fonksiyonlar olumsuz etkilenmektedir (Karlopudi, Srikala, & Rao 2012; Stephan, Nolte, & Hoppen 2003). Panciera, & Refsal (1994) deneysel konjestif kalp yetmezliği şekillendirdikleri köpeklerde serum serbest (fT4) ve total thyroxine (tT4) düzeylerinde azalma tespit etmişlerdir. DCM'li köpeklerde yapılan bir çalışmada düşük serum fT4 ve tT4 temelinde hipotiroidizm varlığına vurgu yapılmış (Karlopudi et al., 2012), ancak bir diğer çalışmada (Beier et al., 2015) Doberman pincherlarda DCM'nin etyoloji ve progresyonunda hipotiroidizmin bir rolü olmadığı ve

tiroid destek tedavisinin klinik iyileşmeye katkı vermediği belirtilmiştir. Hipotiroidizmlı hastalarda çabuk yorulma, mukoz membranlarda solgunluk, anemi potansiyeli ve karaciğer enzimlerinde artışların olması, konjestif kalp yetmezliğinin klinik sunumuna benzerlik göstermektedir (Karlopudi et al., 2012; Stephan et al., 2003). Bu bilgiler tiroid fonksiyonları ve kalp yetmezliği gelişimi arasında çelişkileri de beraberinde getirmektedir. Bu çalışmada da tiroid fonksiyonları diğer çalışmalarda olduğu gibi (Beier et al., 2015; Karlopudi et al., 2012) serum tT4 ve kolesterol düzeyleri ile değerlendirilmiş; her iki grup arasında ortalama serum tT4 ve kolesterol açısından istatistiksel önemde farklılık olmamakla birlikte, minimum ve maksimum değerleri de referans sınırlarda kalmıştır. Bu çalışmada özellikle C ve D sınıflarında bazı olgularda saptanan düşük FT4 düzeylerinin hipotiroid veya kalp yetmezliğine bağlı ötiroid (euthyroid) sendromu ile ilgili olabileceği düşünülmüştür (Willard, & Tvedten, 2012).

D vitaminin (25-hidroksivitamin-D [25(OH)D]) insanlarda kalp fonksiyonunda rol oynadığına dair bilgiler söz konusudur (Bouillon et al., 2008; Lee et al., 2008). Son yapılan çalışmalarda (Kraus et al., 2014) köpeklerde serum D vitamini ile KKY arasındaki ilişki de ortaya konmuştur. Bu çalışmada serum D vitamini semptomatik hastalarda asemptomatik olanlara göre istatistik düzeyde düşük bulunmuş, hatta D sınıfı hastalardaki ortalama değer C sınıfına göre de belirgin düşük tespit edilmiştir. Kraus et al. (2014) KKY'li köpeklerde sağlıklı olanlara göre serum 25(OH)D düzeyini %25 daha düşük belirlemişlerdir. Çalışma verilerimiz kontrole göre C sınıfı hastalarda %25 düzeyinde, D sınıfı hastalarda ise %50 düzeyinde bir azalmayı göstermiş; KKY şiddeti ile serum 25(OH)D düzeyi arasında negatif bir korelasyon olabileceğini düşündürmüştür. Kalsitriol (D vitamininin aktif metaboliti) uygulamasının deneysel D vitamini eksikliğinde gözlenen miyokardiyal kasılma yetersizliğini gidermesi; KKY tedavisi için yeni ve farklı bir bakış açısı getirmiştir. Köpeklerin diğer birçok tür gibi kutanöz 7-dehidrokolesterolü D3 vitaminine dönüştürememesi; tedavi aşamasında bu vitamin takviyesini gerekli kılmaktadır (Kraus et al., 2014). Osuga et al. (2015) köpeklerde yaptıkları çalışmada ortalama serum 25(OH)D düzeyini ACVIM'e göre B2 hastalarında 33.2 nmol/L (13.2 ng/ml) ve semptomatik hastalarda da (C ve D sınıfı birlikte) 13.1 nmol/L (5.2 ng/ml) olarak belirlemişler; bu değerlerin B1 hastalarından

daha düşük (52.5 nmol/L veya 21 ng/ml) olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışma bulgularımız da A sınıfına göre (24,1 ± 3,4 ng/ml) B2 (28,9 ± 6,6 ng/ml), C (17,5 ± 4,0 ng/ml) ve D sınıflarında (11,8 ± 4,9 ng/ml) dereceli bir azalmayı göstermiş, serum 25(OH)D düzeyinin KKY klasifikasyonunda kullanılabilirliğini ve tedavi aşamasında takviye edilmesinin yararlı olabileceğini desteklemiştir.

Osuga et al. (2015)'ın ifade ettiği gibi bulgularımız (serum vitamin D düzeyinin kalp yetmezliği şiddetlendikçe azalması) yetersiz D vitamini durumunun KKY'li köpeklerde kardiyak yeniden şekillenmeye katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar; D vitamininin miyokardiyal hipertrofi ve fibrozis, RAAS ve proinflamatuvar sitokinlerin yanısıra miyokardiyal ekstrasellüler matriks dönüşümünün modülasyonunu baskılayarak kardiyak yeniden şekillenmenin düzenlenmesinde oynadığı rolleri destekler niteliktedir (Osuga et al., 2015). Ayrıca, D vitamini miyokardiyal hipertrofi ve fibrozda rol oynayan paratiroid hormonunun üretimini baskılayarak miyokard üzerinde dolaylı bir koruyucu (anti-remodeling) etki de göstermektedir (Osuga et al., 2015).

KKY ile hemostazis (koagülasyon) arasında özellikle insanlarda önemli bir bağlantı söz konusudur ve böyle durumlarda trombin aktivitesi, fibrinolitik aktivite ve trombosit aktivasyonunda artmadan bahsedilmektedir. İnsanlarda kalp yetmezliğine bağlı olarak tromboembolizm ve stroke (inme) olgularıyla sık karşılaşılsa da KKY'li köpeklerde bu durumun prevalansı oldukça düşüktür. Tromboembolik komplikasyonlar; trombositoz, hemokonsantrasyon ve hiperviskozite gibi prokoagülan ve antikoagülan faktörler arasındaki dengesizliğe bağlanmaktadır. Protein C ve antitrombin III (AT-III) başlıca doğal antikoagülanlar olarak aşırı pıhtılaşmayı önlemede önemli bir rol oynarlarken, fibrinojen ve d-dimer düzeyindeki yükselmeler de tromboembolik eğilimi göstermektedirler. Tarnow et al. (2007) KKY'li köpeklerde serum d-dimer düzeylerini sağlıklı kontrollere göre yüksek bulmuşlardır. Prihirinkut et al. (2014) MMVD'li köpeklerde kalp yetmezliği şiddeti arttıkça serum d-dimer düzeylerinde de istatistiksel bir yükselme belirlemişler; bu durumun hiperkoagülasyon indikatörü olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada KKY sınıfları arasında

standart hatanın yüksek olması nedeni ile rakamsal farklılıklar olmasına rağmen istatistiksel bir farklılık oluşmamış; B2 ve D sınıfı hastalarda maksimum d-dimer düzeylerinden dolayı bazı olgularda fibrinolitik aktivitenin yüksek (tromboembolizm riski) olabileceğini düşündürmüştür.

5.4. Kalp yetmezliği ve İnflamasyon

İnsan ve köpeklerde yapılan çalışmalar sistemik inflamasyonun KKY gelişiminde önemli rol oynadığını göstermiştir (Braunwald, 2008; Petric et al., 2018). İnflamasyon tanımlamasında serum akut faz proteinleri (APPs) ve sitokin düzeyi ölçümlerinden yararlanılmaktadır. Bu çalışmada APPs olarak; CRP, haptoglobin (Hp), ferritin, PON1 ve BChE, sitokin paneli olarak da 13 sitokin ölçümü yapılmıştır. İnsanlarda TNF- α , CRP ve interlökinleri de içine alan sitokinlerin kalp yetmezliğinin şiddetine paralel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (Oikonomou et al., 2011). Rutin çalışmalarda inflamasyon varlığı ve şiddeti tam kan sayımında total ve diferansiyel lökosit sayıları ile ortaya konmaktadır. Günümüzde teknolojinin yaygınlaşması ile bu amaçla köpeklerde serum CRP ölçümleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda köpeklerde yapılan bir çalışmada serum CRP düzeyinin total WBC ve nötrofil sayıları ile pozitif korelasyona sahip olduğu, ancak bu istatistiksel düzeydeki anlamlı korelasyonun sadece şiddetli KKY'li olgularda görüldüğü belirlenmiştir (Petric et al., 2018). Bu çalışmada inflamatuvar yanıtların belirlenmesi adına serum APPs bakılmış; serum CRP ve Hp'nin özellikle şiddetli kalp yetmezliği grubunda (D sınıfı) kontrol (A sınıfı) ve B2 sınıflarına göre istatistiksel düzeyde artışlarına, serum PON1'in ise azalmasına tanık olunmuştur. Bu sonuçlar KKY sürecinde de köpeklerde CRP ve Hp'nin pozitif ve majör APPs olarak, PON1 ve BChE'nin de negatif APPs olarak davranışlarını sergilediğini göstermiştir. Benzer şekilde insanlarda kardiyovasküler hastalıklarda birçok pozitif APPs'nin (CRP, SAA, fibrinojen, ferritin ve seruloplasmin) arttığı, negatif APPs'lerin ise (albümin, transferrin, retinol bağlayıcı protein, antitrombin ve transkortin) azaldığı rapor edilmiştir (Ahmed, Jadhav, Hassan, & Meng, 2012).

Dekompenze konjestif kalp yetmezlikli köpeklerde total WBC ve nötrofil sayılarının kompanze kalp yetmezlikli ve sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Petric et al., 2018). Aynı çalışmada (Petric et al., 2018) bu yangısal yanıtlar serum CRP düzeylerindeki artışla konfirme de edilmiştir. CRP değerinin LV-EF değeri ile negatif korelasyonda olması; inflamasyon sürecinde sepsis-ilişkili miyokardiyal disfonksiyon (SIMD) benzeri bir durumu düşündürmektedir (Petric et al., 2018). Serum CRP değerinin mitral akım E dalga maksimal velositesi ile pozitif korelasyonda olması (Petric et al., 2018); bu çalışmamızda LV diyastolik fonksiyon bozukluğunda ve mitral akım restriktif E/A oranlarının oluşumunda inflamatuvar sürecin de katkısı olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamızda D sınıfı köpeklerde serum PON1'deki azalma, PON1'in HDL'nin oksitlenmesine engelleyen koruyucu etkisindeki eksikliğin KKY'nin şiddetlenmesine yol açabileceğini ve PON1 aktivitesi ile kalp yetmezliğinin şiddeti arasındaki negatif bir korelasyon olabileceğini göstermiştir. PON1; arterosklerozis ve ilgili vasküler hastalıklarda kardiyoprotektif etki yaratan bir enzim olarak bilinmekte (Chistiakov, Melnichenko, Orekhov, & Bobryshev, 2017) ve aktivitesi insanlarda KKY'de (Kim et al., 2013; Eren ve diğerleri, 2015) ve oksidatif stresin arttığı diabetes mellitus ve hiperkolesterolemi gibi durumlarda azalma göstermektedir (Elkiran ve diğerleri, 2007). Serum PON1 aktivitesinin makrofajlardaki oksidatif stres ile ters orantılı olduğu ve eksikliğin ROS üretimini artırdığı bilinmektedir (Elkiran ve diğerleri, 2007). Bu nedenle kemokin, APPs ve PON1 düzeyinde saptadığımız değişimler; KKY'nin progresyonunda oksidatif proses ve sistemik inflamatuvar aktivitenin rolünü ve PON1'in potansiyel anti-oksidant kompanzatorik etkilerini destekler niteliktedir. Mahadesh-Prasad et al. (2014)'ın çalışmasına paralel olarak bu çalışmada DCM'li köpeklerdeki serum PON1 aktivitesi MMVD'li köpek değerlerinden daha düşük bulunmuş, PON1 aktivitesi ve DCM şiddeti arasında negatif korelasyon olduğu düşünülmüştür.

Serum ferritin düzeyi vücuttaki demir rezerve hakkında dolaylı olarak bilgi veren sensitif bir biyoindikatördür. CRP'ye paralel değişim gösteren serum ferritin pozitif bir APPs olduğu ve kalp hastalıkları ve diabetes mellitus gibi yangısal durumlarla ilgili

olduğu rapor edilmiştir (Ahmed et al., 2012). Yüksek serum demir (yüksek ferritin) düzeyinin kardiyovasküler riski en az 2 kat artırdığı, bunun da HDL kolesterol oksitlenmesindeki artıştan ileri geldiği bildirilmiştir (Ahmed et al., 2012). Bu çalışmada istatiksels düzeyde olmamakla birlikte D sınıfı hastalarda ortalama ferritin düzeyinin (>200 µg/L) diğer gruplara göre daha yüksek olması; ileri KKY'li köpeklerdeki ferritin ve buna bağlı HDL oksitlenmesi ile vaskulitis ve arterosklerozis risklerinin artışı olarak yorumlanabilir. İnsanlarda serum ferritin > 200 ng/mL olduğunda miyokardiyal infarktüs riskinin 2.2 kat artması, KKY'li köpeklerde serum ferritin düzeyindeki artmanın olası etkileri ve komplikasyonları açısından yeni çalışmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır.

Serum Hp bir diğer majör pozitif APPs dir ve yüksek oranda hemoglobinin moleküle bağlanma affinitesi göstermektedir. Bu bağlanma *in vivo* hemoliz ile ortaya çıkan ve oksidatif hasar oluşturma potansiyelindeki hemoglobinin detoksifikasyonuna da imkan sağlamaktadır (Ahmed et al., 2012). Bu çalışmada serum Hp düzeyinin sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında sadece ileri kalp yetmezliği grubunda (D sınıfı) istatiksels düzeyde artma göstermesi; Hp nin pozitif APPs davranışlarını ile uyumlu bulunurken, dalaşımdaki olası serbest hemoglobin düzeyinin düşürülmesine yönelik bir davranış olarak da dşnlmştir. Hp ve hemoglobinin kompleksinin endojen nitrik oksit düzeyini yükseltmesi (Ahmed et al., 2012), bu bağlanmanın vasküler sistem ve anti-oksidasyon açısından vücudun bir savunma reaksiyonu olabileceği düşüncesini güçlendirmektedir.

Bu çalışmada negatif APPs olarak kabul edilen serum BChE düzeyinde gruplar arasında istatiksels düzeyde bir farklılık oluşmamıştır. Memeli kan dolaşımında iki tip kolinesteraz bulunmakta; biri eritrosit kolinesterazı olarak bilinen asetilkolinesteraz, diğerisi de temel olarak karaciğerden sentezlenen ve plazma kolinesterazı olarak bilinen BChE'dir. BChE'nin lipid metabolizması ve inflamasyon patogenezindeki rollerinden bahsedilmektedir (Tvarijonaviciute et al., 2012 ve 2013). BChE'nin PON1'i oksidatif stresden koruması (Tvarijonaviciute et al., 2012); APPs'nin birbiri ile aralarında var olan kompleks patofizyolojik etkileşimlerin bir örneğini yansıtılmaktadır. Son bir

çalışmada (Sun, Qi, Tan, & Yang, 2016) BChE aktivitesi akut koroner sendromlu hastalarda bağımsız bir prognostik faktör olarak gösterilmiş, ancak altta yatan mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Aynı çalışmada serum BChE aktivitesi KKY olgularında diyagnostik açıdan önemli bir parametre olarak tanımlanmıştır. İnsanlarda serum BChE ile LV-EF değeri arasında pozitif korelasyon gösterilmiş, hatta akut miyokardiyal infarktüsle olup yaşayanlarda ölenlere göre serum BChE düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgular düşük BChE düzeyinin akut miyokardiyal infarktüsle hastalarda zayıf kalp fonksiyonları nedeni ile kötü prognoz bulgusu olabileceğini göstermiştir (Sun et al., 2016).

Son yıllarda klinik ve deneysel çalışmalar kalp yetmezliğinde reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) artmasıyla oksidatif stresin de arttığını göstermiştir. ROS'lar hücresel işlev bozukluğuna, protein ve lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına yol açarken, kardiyovasküler hastalıklarda geri dönüşümsüz hücre hasarı ve ölümüne de neden olabilmektedirler (Tsutsui, Kinugawa, & Matsushima 2011). Bu konuda yapılan birçok çalışmada oksidatif stres parametreleri olarak genellikle malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeyleri değerlendirilmişken (Todorova et al., 2005; Michalek, Tabis, & Noszczyk-Nowak 2020), bu çalışmada Rubio et al. (2016a) tarafından önerildiği gibi total anti-oksidan kapasite (TAC), serum trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC), ve kuprik indirgeme antioksidan kapasite (CUPRAC) değerleri ile irdelenmiştir. Bulgularımız A ve B2 sınıfı hastalara göre ileri KKY'si olan D sınıfı hastalarda serum TEAC, Thiol85/ ve CUPRAC değerlerinin istatistiksel düzeyde düştüğünü göstermiş, bu durum; anti-oksidant sistemdeki azalma ile KKY arasında negatif bir korelasyon olabileceğini göstermiştir. Bu düşüncemiz; insan (Deswal et al., 2001) ve köpek çalışmalarında (Zois et al., 2012; Polizopoulou et al., 2015; Michalek et al., 2020) APPs ve yangısal sitokinler kadar oksidatif stresin de KKY patogenezinde önemli rol oynadığını gösteren çalışma bulgularını destekler niteliktedir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalar APPs, inflamatuvar sitokinler ve oksidatif stresin insanlarda (Deswal et al., 2001) ve köpeklerde (Zois et al., 2012; Polizopoulou et al., 2015) KKY patogenezinde rol oynayabileceğini göstermesine rağmen kalp

yetmezliğinin farklı aşamalarında inflamatuvar biyobelirteçlerin nasıl değiştiği henüz bilinmemektedir. Bu çalışmanın amaçlarından biri de bu eksikliğin giderilmesi içindir.

KKY'li insanlarda inflamatuvar sitokinlerin ve birkaç kemokin ekspresyonunun ve salımının arttığını gösteren bazı yayınlar bulunmaktadır (Gullestad et al., 2012; Aukrust et al., 1998; Aukrust et al., 1999). Bu çalışmada serum sitokin ve kemokin paneli 13 parametre ile (IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, IP-10, MCP-1, GM-CSF, KC-like, TNF- α ve IFN- γ) değerlendirilmiş; KKY'nin semptomatik (C ve D sınıfları) evrelerinde asemptomatik (B2 sınıfı) ve sağlıklı köpeklere göre (A sınıfı) sadece serum KC-like düzeyinde istatistiksel düzeyde değişim (artma) belirlenmiştir. Nötrofil kemotaksisi ile ilgili bir parametre olan KC-like proteini ile ilgili bilgiler sınırlı olmakla birlikte sistemik inflamasyonda rol oynadığı düşünülmektedir. KC-like'nin plazma düzeylerindeki artışlar yaşlı farelerde şiddetli kardiyak depresyon ile ilişkilendirilmiştir (Slimani et al., 2014). Bu çalışmada KC-like ile diğer parametrelerin (CRP, Hp, ferritin ve WBC ve nötrofil sayıları) pozitif korelasyon göstermesi KKY'nin ilerlemesinde bu kemokin ile APPs arasındaki etkileşimin rolü olabileceğini düşündürmektedir. KC-like gibi inflamatuvar mediatörlerin hasarlı miyokardiyumdan ya da dolaşımdaki bazı hücrelerden (WBC, endotel hücreleri ve plateletler) ve dokulardan (karaciğer ve akciğerler) salınarak miyokardiyal depresyon, endotelial disfonksiyon ve kardiyak myosit apoptozisine yol açabileceği düşünülmektedir (Yndestad et al., 2006; Cunningham et al., 2012).

Çalışmamıza benzer olarak bir önceki çalışmada Zois et al. (2012) KKY'li köpeklerde bir diğer kemokin olan serum MCP-1 düzeyinin sağlıklı köpeklere göre arttığını, bazı IL'lerin (IL-2, IL-7 ve IL-8) ise hastalık şiddeti ile azaldığını bildirmişlerdir. İnsan çalışmaları da KKY patogenezisinde inflamasyonun önemli bir rol oynadığını, sitokin üretim ve serum düzeylerindeki artmanın (TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8) hastalığın progresyonu ve negatif prognozla ilgili olduğunu göstermiştir (Mavropoulou et al., 2016). Köpeklerde yapılan bir çalışmada sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında MMVD'li köpeklerde serum IL-8 düzeyinin yüksek çıktığı, hatta MMVD şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Mavropoulou et al., 2016). Çalışmamızda C sınıfı

hastalarda bazı olgularda IL-8 değerlerin kontrollere göre daha yüksek olduğu görülmüş, ancak muhtemeldir ki düşük örnek sayısı nedeni ile istatikselsel bir önem oluşmamıştır. Camacho et al. (2017) MMVD'li köpeklerde B2 ve C sınıflarında sağlıklı kontrollere göre serum IL-1 β ve IL-4 düzeylerinde anlamlı derecede artma belirlemişler, serum TNF- α ve CRP seviyelerinde ise istatikselsel düzeyde bir değişim saptayamamışlardır. Bu değerlendirmeler IL düzeylerinin kalpteki morfolojik değişimlerde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda kalp yetmezliğinin ilerlemiş evrelerinde tüm antioksidan biyobelirteçlerin düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Belch, Bridges, Scott, & Chopra (1991)'nin yaptıkları çalışmada elde ettikleri bulgu (KKY'li insanlarda tiyol düzeyinin azalması) ile çalışma sonuçlarımız paralellik göstermektedir. Miyokardiyal kontraktilite azalması veya basınc / volüm yüklenmesi miyokard iskemisine yol açarken ksantin oksidazda (XO) bir artış, SOD ve GPx aktivitesinde ise azalma rapor edilmiştir (Guarnieri et al., 1980). ROS tarafından LDL'nin oksidatif hasara uğratılmasının; kapak lezyonlarının başlaması ve ilerlemesinde de etkili olabileceği belirtilmiştir (Olsson et al., 1999). Bu durum KKY'li hayvan modellerinde miyokardiyal antioksidan savunmanın da bozulabileceğini öneren hipotezler ile uyumlu görülmektedir (Mak, & Newton, 2001). Ayrıca, kalp kasındaki ROS artışının sıçanlarda kardiyak fibrozise yol açtığı da unutulmamalıdır (Tanaka, & Shimizu, 2012). Sunulan bu çalışmada D sınıfı hastaların serum antioksidan kapasite ve antioksidan enzim düzeylerinde belirlediğimiz bu azalma; KKY altyapısında var olan ve hastalığın ilerlemesiyle de devam eden oksidatif stres durumu ile ilgili olabilir. Bu ve diğer çalışmalar (Guarnieri et al., 1980; Mavropoulou et al., 2016; Mak, & Newton, 2001) antioksidan biyobelirteçlerin dolaşımdaki düzeylerinin azalması ve antioksidan ve oksidanlar arasındaki dengesizliklerin bazı inflamatuvar sitokinlerin indüklenmesine ve serum düzeylerinin artışına yol açabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada D sınıfı köpeklerde inflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerindeki değişikliklerin daha belirgin olması; inflamasyon aktivitesi ve antioksidan sistemdeki bozulmanın derecesi ile hastalığın yani KKY'nin şiddeti arasında negatif bir korelasyon olabileceğini göstermiştir.

Çalışmaya katılan tüm köpeklerin tedavi öncesi ve sonrası değerleri ele alındığında; inflamasyon biyobelirteçlerinin serum düzeylerinin azalmasının yanında antioksidan biyobelirteçlerde de bir artış göze çarpmıştır. Bu sonuçlar; çalışmaya katılan köpeklerin sayılarının az ve farklı ırklardan olmasına rağmen CRP ve antioksidan biyobelirteçler gibi parametrelerin özellikle D sınıfı hastalarda tedavinin izlenebilirliği için kullanışlı klinik biyobelirteçler olabileceğini destekler niteliktedir.

CRP düzeyleri ile LV çapı ve LA / Ao oranı arasındaki pozitif korelasyon bulgumuz KKY'li köpeklerde daha önce yapılan bir çalışma ile uyumlu görülmektedir (Reimann et al., 2016). Bu bulgularla birlikte ekokardiyografik değişkenler ile serum PON1 düzeyleri arasında bulunan negatif korelasyon da APPs'nin köpeklerde KKY patofizyolojisinde olası rollerini göstermektedir. Serum MCP-1 proteinin serum cTnI ve ekokardiyografik parametre LVIDDn ile pozitif korelasyonu; insanlarda olduğu gibi (Ritter et al., 2017) MCP-1'in miyokardiyal hasar ve kardiyak yeniden şekillenmede önemli bir role sahip olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, serum antioksidan parametreleri ile (CUPRAC, TEAC, tiyol düzeyleri) LV çapları arasındaki negatif korelasyon saptanması; B2 sınıfından D sınıfı kalp yetmezliğine doğru kardiyak yeniden şekillenmenin gelişiminde antioksidan sistemdeki yetersizliğin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda antioksidan kapasite eksikliğinin miyokardiyal hasar ve KKY gelişimi için bir risk faktörü olabileceği (Hill ve Signal, 1996), hatta KKY gelişiminde antioksidan eksikliğinin yanı sıra oksidatif stres artışının da rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (van der Pol, van Gilst, Voors, & van der Meer, 2019). Bu bulgulara dayanılarak tedavide antioksidan takviyelerin köpeklerde KKY'nin ilerlemesini yavaşlatmak veya önlemek için yararlı olabileceği söylenebilir.

5.5. Kalp Yetmezliği ve Serum Proteomlarındaki Değişimler:

Bu çalışmada ACVIM sınıflandırmasına göre kalp yetmezliği tanımlanmış köpeklerde düşük moleküler ağırlıklı serum proteinlerinin (proteom) analizi yapılmış; *Canis lupus familiaris* (evcil köpek) veri bankasına göre (www.uniprot.org) proteinler tespit edilmiştir.

Son yıllarda kütle spektrometresi (MS) ve kromatografik seperasyon teknikleri birlikte kullanılarak protein tespitleri yapılmakta, böylece daha sağlıklı ve güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Ultra performans likit kromatografi (UPLC) tekniğinin; MS ve LC-MS yaklaşımına göre daha üstün olduğu, daha kısa sürede, yüksek doğrulukta ve düşük moleküler ağırlıktaki proteinlerin detaylandırılmasına olanak sağladığı belirtilmektedir. UPLC sistemi MS ile kombine edildiğinde; bilinen (yapılan çalışmalarla tanımlanan) proteinlerin hızlı ve doğru analizi ile birlikte kompleks matriks yapıda bilinmeyen (tanımlaması henüz yapılmamış) proteinlerin de açıklaması yapılabilmektedir (Xue et al., 2014). Bu bilgiler, sunulan bu çalışmada proteomik analizler için güncel ve güvenilir metotların kullanıldığını göstermiş; UPLC-ESI/QTOF/MS sistemi (ultra-performance liquid chromatography- electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight high-definition mass spectrometry) ile elde ettiğimiz sonuçların gradientleri önerildiği gibi (Xue et al., 2014) Waters UPLC analizi ile ortaya çıkartılmıştır. Bu yaklaşımla öncelikle örneklerdeki makro moleküler ağırlıktaki proteinler (albümin, globülin, transferin, immunoglobulinler, haptoglobin vb.) immünolojik olarak ortamdaki uzaklaştırılmış ve geride kalan düşük moleküler ağırlıklı (low abundance) proteinlerin analizine imkân yaratılmış, böylece bu çalışma için toplam 157 protein tespitine olanak sağlanmıştır.

Tüm proteinlerin Pantergo programı ile yapılan analizlerinde moleküler (bağlayıcı, katalitik ve regülatör aktivite) ve biyolojik (biyolojik regülasyon, signaling ve hücrel ve immun sistem prosesleri) görevleri düşünüldüğünde bu proteinlerin KKY sürecinde oynayabileceği rollerin görüldüğünden daha fazla olabileceği söylenebilir. Hücrel lokalizasyonlardaki (intrasellüler, ekstrasellüler ve protein içeren kompleksler) çeşitlilik bu proteinlerin uyarılma, sekresyon ve dolaşıma salınma aşamalarında hücrelerin bir bütün olarak reaksiyona katkı verdiğini göstermiştir. Bununla birlikte tespit edilen bu proteinlerin apoptosis ve koagülasyon süreçlerinde yer alması; KKY'li olan hastalarda myokardiyal nekrosis ve tromboemboli komplikasyonlarının patofizyolojisinin açıklanmasına katkı verebilir görülmektedir. Bu çalışmada tespit ettiğimiz proteinlerin immunité, transfer, protein bağlama ve enzimler üzerindeki olası etkileri KKY patofizyolojisinin

detaylandırılmasına ve tanı - tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

Köpeklerde serum proteomlarının belirlendiği çalışmaların sayısı az olmakla birlikte (Kocatürk ve diğerleri, 2016; Locatelli et al., 2019; Kules et al., 2020), farklı kalp yetmezliği sınıflarının birlikte çalışıldığı herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Kalp yetmezlikli köpeklerde serum proteomik çalışılması ile ilgili olarak Locatelli et al. (2019) mitral kapak hastalıklı köpek (n=8) verilerini sağlıklı kontrol grubu (n=4) ile karşılaştırmışlar; 8 anlamlı protein bulabilmişlerdir. Bu çalışmada kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda 1 proteinde artış, 3 proteinde azalış; C sınıfı hastalarda 8 proteinde artış, 8 proteinde azalış ve D sınıfı hastalarda da 2 proteinde artış, 10 proteinde ise azalış belirlenmiştir.

5.5.1. B2 Sınıfı Protein İfade Farklılıkları

Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda angiotensinogen (AGT) seviyesi artarken, lipopolysaccharide binding protein (LBP), carboxypeptidase N subunit 2 (CPN2) ve immunoglobulin iota chain like (VREB1) seviyelerinde azalma belirlenmiştir. B2 hastalarında serum AGT düzeyinde saptanan bu artış; pre-klinik (asemptomatik) safhada olmalarına rağmen MMVD ve DCM'li köpeklerde sempatik sistem aktivasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Ancak B2 hastalarında saptanan bu artışın D sınıfı hastalarda da benzer düzeyde olması; KKY'nin sınıflandırılması veya hastalığın şiddetinin belirlenmesinde serum AGT düzeyinin kullanışlı bir biyobelirteç olamayacağını düşündürmüştür. Bu bakışa paralel olarak Uijl, Ren, & Danser (2017) AGT'nin sol kalp sistolik fonksiyon yetersizliği olan (LV-EF <%50) insanlarda artmasına rağmen tek başına hastalığı ve şiddetini yansıtan bir biyobelirteç olamayacağını ileri sürmüşlerdir. Diğer taraftan Xu, Rong, & Zhang (2020) AGT'nin kalp yetmezliği, arterosklerozis, hipertansiyon ve diğer kardiyovaskular risklerle yakından ilgili olduğu bildirimleri bu çalışmada asemptomatik ve semptomatik hastalarda bu proteinde saptadığımız yükselimler ile birleştirildiğinde; AGT'nin köpeklerde de KKY patofizyolojisinde önemli olabileceği varsayımlarını güçlendirmektedir.

Karaciğerden üretilen AGT öncelikle böbrekler tarafından salgılanan renin ile angiotensin-I'e, takiben de dönüşüm enzimleri (ACE) ile angiotensin-II'ye dönüştürülmektedir. AGT'nin moleküler görevleri arasında; endopeptidaz inhibitor aktivitesini gerçekleştirmesinin yanı sıra G proteinine bağlı reseptör sinyal yolu olmak, böbrek gelişimi, nörotrofin reseptör sinyal yolunun düzenlenmesi, janus kinaz aktivitesinin pozitif regülasyonu, protein tirozin aktivitesinin düzenlenmesi, kalp iletiminin düzenlenmesi ve RAAS ile sistemik arteriyel kan basıncının düzenlenmesi gibi fonksiyonel görevleri bulunmaktadır. Lu et al. (2016) AGT'nin tüm angiotensin peptidlerinin öncüsü olduğunu ve genel olarak RAAS sisteminin pasif bir substratı olarak görülmesine rağmen fonksiyonlarının karmaşık olduğunu vurgulamışlardır.

İnsanlarda yapılan bir çalışmada (Iyer, Heublein, Benike, & Burnett, 2015) kalp yetmezliği ile sağlıklı kontrollerin serum AGT düzeylerinde istatistiksel düzeyde bir farklılık olmamasına rağmen üriner AGT'de kalp yetmezliği grubunda anlamlı bir yükselim belirlenmiştir. Bu yükselimde AGT'nin lokal olarak renal tubuler hücreler tarafından da üretiliyor olması etkili görülmüştür. Ayrıca Yokoyama et al. (2019)'ın insanlarda yaptıkları bir çalışmada idrar AGT/Cr oranının KKY'li hastalarda arttığını, tedavi sonrası bu oranın azalmasına rağmen nökslü hastalarda yeniden arttığını saptamışlardır. Bu ve bizim çalışma sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde; tür farklılığına bağlı olarak serum AGT değişimlerinde farklılıklar yaşanabileceği gibi köpeklerde de kalp yetmezliklerinde idrar AGT düzeylerinin incelenmesinin yararlı olabileceği kanısı uyanmıştır. Bir diğer insan çalışmasında (Millen, Woodiwiss, Gomes, Michel, & Norton, 2018) LV diyastolik fonksiyon bozulması ile serum AGT düzeyi arasındaki ilişkiden bahsedilmesi; bu çalışmadaki köpeklerin (B2 ve D sınıfları) LV fonksiyonlarında belirlediğimiz anormalliklerin (sistolik ve diyastolik) mekanizmasında serum AGT'nin de bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada bir diğer serum proteini LBP'nin A sınıfı ile karşılaştırıldığında B2 sınıfı hastalarda azaldığı, D sınıfı hastalarda ise arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar serum LBP düzeyinin kalp yetmezliği şiddeti ve süresine bağlı olarak bifazik reaksiyon verebileceğini, LBP'nin bir akut faz proteini olduğu düşünüldüğünde de (Lepper et al.,

2011; Asada et al., 2019) D sınıfı hastalarda şiddetli inflamatuvar durumun ve KKY şiddetinin bir yansıması olabileceğini göstermektedir. LBP'nin "uniprot" gen veri bankasındaki fonksiyonlarına bakıldığında; lipopeptid, lipopolisakkarit ve lipoteikoik bağlayıcı olmasının yanısıra sinyal-reseptör bağlantısında görev aldığı da belirtilmektedir. Asada et al. (2019) insanlarda yaptıkları bir çalışmada yüksek serum LBP düzeylerinin kardiyovasküler hastalık gelişmesi ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Bir önceki çalışmada ise yanık hasarını takiben yüksek LBP düzeylerinin *in vitro* ortamda kardiyomyosit sarkomer kontraktıl fonksiyonlarını restore ettiği, bunu termal hasara bağlı olarak endotoksinlerin kardiyomyosit üzerindeki inhibitör etkilerini ortadan kaldırarak yaptığı rapor edilmiştir (Niederbicher et al., 2011). Dolayısıyla bu çalışmada D sınıfı hastalarda serum LBP düzeyinde saptadığımız önemli yükselim, KKY sürecinde lipopolisakkaridlere (LPS / endotoksin) sürekli maruz kalımın ve kronik inflamatur yanıtların bir göstergesi olarak görülebilir (Asada et al., 2019). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D sınıfı hastalarda serumda LBP düzeyi yükselirken B2 hastalarında düşme eğiliminde olması; gruplar arasında (B2 ve D) yangısal reaksiyon şiddetinin farklı olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada kontrole göre B2 hastalarında serumda düzeyi azalan bir diğer protein; CPN2 olarak belirlenmiştir. CPN2'nin ana işlevi net olarak bilinmemekle birlikte tamamlayıcı bir anafilatoksin olduğu, kan dolaşımında bulunan peptidleri (kinin ve CK-MM vb.) regüle ettiği ve peptid aktivitesi ve reseptör bağlantılarını değiştirme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Wu, 1989). CPN'nin vücudu inflamatuvar peptidlerden (kininler) ve anafiotoksinlerden (komplement C3 gibi), hatta kalbi aşırı basınç yüklemesinden koruduğu rapor edilmiştir (Chen et al., 2020). Bu çalışmada B2 hastalarında saptadığımız azalmanın hemodinamik stres ve komplement aktivasyonunun (C3) baskılanması adına koruyucu bir mekanizmadan ve/veya CPN'nin aşırı kullanımından ileri gelebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda serum immünoglobulin iota chain-like protein (VREB1) düzeyi B2 hastalarında A sınıfına (kontrol) göre düşük bulunmuştur. İmmunoglobulin free like-chain (FLC) proteini ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen (Jackson et al., 2015;

Matsumori et al., 2020) henüz VREB1 düzeyinde meydana gelen değişimlerin KKY'de ne anlama gelebileceğini açıklayan veriler söz konusu değildir. FLC-kappa / lamda oranının miyokarditis ile birlikte kalp yetmezliği için biyobelirteç olabileceği düşünülürken (Matsumori et al., 2020), serum FLC düzeyleri dekompanze kalp yetmezlikli hastalarda mortalite tahmini için kullanışlı indikatörler olarak ileri sürülmüştür (Jackson et al., 2015). Bu protein ailesi içinde yer alan VREB1'in B-hücre farklılaşmasında immunoglobulin genlerini regüle ettiği (Ferrari et al., 2007), B-hücre sinyal yolağını aktive ettiği, immünoglobulin üretimi ve lökosit göçünden sorumlu olduğu bilindiğinden bu çalışmada bu proteinde saptadığımız azalmanın KKY sürecinde köpeklerde immunolojik yanıtların azalmasına yol açabileceği değerlendirilmiştir.

5.5.2. C Sınıfı Protein İfade Farklılıkları

Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda 8 proteinde artma, 8 proteinde ise azalma belirlenmiştir. Artan proteinler; complement proteinleri (C3 ve C4a), carboxypeptidase N catalytic chain isoform 1 (CPN1), argininosuccinate lyase (ASL), inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H2 (ITIH2) ve H4 (ITIH4; isoform X1 ve X3) ve nuclear mitotic apparatus protein 1 (NUMA1) iken, azalan proteinler; complement proteinleri (C7, C8a, factor I isoform ve factor D), pigment epithelium-derived factor (PEDF), actin cytoplasmic (ACTB), apolipoprotein C2 precursor (Pre-ApoC-II) ve hemopexin (HPX) olmuştur.

Komplement sistem hem immünoprotektif hem de pro-inflamatuar özellikteki sitokinlerin üretimi ve regülasyonu için birlikte hareket eden yirmiden fazla serum proteininden oluşmaktadır. Bu komplementlerin aktive olması; lökosit aktivasyonu, sitokin üretimi, miyosit lizisi, endotel hücre aktivasyonu, vazokonstriksiyon ve tromboz yoluyla kardiyak doku hasarına yol açabilmektedir (Clark et al., 2001). Bu alışmada C sınıfı hastalarda serum komplement C3 ve C4a düzeyleri yüksek bulunmasına rağmen diğer komplement ürünleri (C7 ve C8a gibi) düşük bulunmuştur. Bu bulgular KKY patofizyolojisinde komplement sistemin rolü olabileceğini belirtilen çalışma bulgularını desteklerken (Clark et al., 2001), bunu farklı komplement proteinlerin farklı yöndeki (up-regülasyon / down regülasyon) değişimleriyle gerçekleştirdiği söylenebilir. Serum

C3 düzeyindeki bu artma kalp hastalıklarındaki kronik immun-inflamatuvar aktivasyonun bir göstergesi olarak da düşünülebilir (Mukherjee et al., 2014). Bu değişimler insanlarda kalp yetmezliğinin şiddetlenmesi ve kardiyak yeniden şekillenme için risk olarak kabul edilmekte ve KKY'li ve mitral stenozisli hastalarda zayıf prognoz nedeni olarak görülmektedir (Mukherjee et al., 2014). Bu ve bir diğer çalışmadan (Frey et al., 2013) elde edilen bulgular (serum komplement C3 düzeyi yüksek olan sistolik kalp yetmezlikli hastaların, düzeyi düşük olan hastalara göre daha uzun sağ kalım sürelerine ulaşmaları ve komplement C3 seviyesi yükseldikçe daha yüksek LV-EF ve daha düşük serum NTpro-BNP değerlerine sahip olmaları); komplement proteinlerin KKY'nin progresyonunu yavaşlatmak için güçlü terapötik ve profilaktik hedefler olarak ileriki dönemlerde daha fazla çalışılması gerektiğini göstermektedir.

Serum CPN düzeyi bu çalışmada farklı kalp yetmezliği gruplarında bifazik bir değişim göstermiş; kontrole göre B2 hastalarında CPN subunit 2 (CPN2) azalırken, C sınıfı hastalarda ise CPN catalytic chain isoform 1 (CPN1) artmıştır. Bu gruplarda farklı yönde değişim gösteren CPN'lerin farklı izoformlarda olması; CPN enzimin KKY progresyonunda kompleks roller üstlendiğini düşündürmüştür. Bu proteinin B2 hastalarında hemodinamik stres ve komplement aktivasyonuna karşı koruyucu bir mekanizma olarak azalırken (Chen et al., 2020), C sınıfı hastalardaki artışın KKY'li köpeklerde artan oksijen ihtiyacının karşılanmasına yönelik olabileceği düşünülmüştür.

Argininosuccinate lysase'ın (ASL) ornitin yoluyla argininin işlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Erez ve diğerleri (2011) insan ve farelerde ASL kaybının hücre dışı arjinin kullanma yeteneğinin bozulması nedeniyle nitrat sentezini de azalttığını tespit etmişlerdir. Winslaw et al. (1995) ise kalp yetmezliğinin şiddeti arttıkça nitrat miktarının da arttığını belirtmiştir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada C sınıfı hastalarda serum ASL düzeyinde saptadığımız artmanın; serum NO düzeyini yüksek tutmak ve böylece damar bütünlüğünü korumak ve dolaşımı aktive etmek için protektif bir konakçı reaksiyonu olabileceği düşünülmüştür. DCM'li hastaların sağ ventrikül dokusunda yüksek kapasiteli indüklenebilir nitrik oksitinin (iNOS) *in vitro* miyokardiyal gevşemeyi arttırması da (Winslaw et al., 1995) bu düşüncemizi destekler niteliktedir.

Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain ve alt ünitelerinin (ITIH2 ve ITIH4) serin tipi endopeptidaz inhibitör aktivitesinde görev almalarının yanı sıra akut faz ve sitokin yanıtlarını oluşturma potansiyelleri de bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda ITIH2 ve ITIH4'ün C sınıfı hastalarda sağlıklı kontrollere göre artması; hastalığa karşı vücudun akut faz yanıtını aktive etmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu reaksiyonda ITIH4'ün anti-inflamatuar bir protein olarak rol olabileceği de düşünülmüştür (Kashyap et al., 2009). Xu et al. (2013) insanlarda yaptıkları çalışmada özellikle ITIH4'ün koroner kalp hastalığında yeni bir biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir. Jiang et al. (2019) ITIH3 ve ITIH4'ün inflamasyon ve karsinogenesis ile ilgisinden bahsetmesi, kısmen bu çalışmamızın KKY ve inflamasyon bağlantısına destek olur niteliktedir.

Uniprot gen veri bankası bilgileri NUMA1'in mitoz bölünmede rol oynadığını, kromozomların ayrılmasını teşvik ederken hücre bölünmesini kolaylaştırdığını göstermektedir. NUMA1 beş farklı NUMA ailesinin (NUMA1, NUMA2, centrosome, middle body ve F-centromere) bir üyesi olarak bilinmekte ve bu proteinlere karşı gelişen antikörlerin oto-immun hastalıkların tanımlanmasındaki önemi vurgulanmaktadır (Szalat et al., 2010; Rattner, Mack, & Fritzler 1998). Bu çalışmada C ve D sınıfı hastalarda serum NUMA1 düzeyinde saptadığımız artma, NUMA proteinlerine karşı olası oto-antikör üretimi ile köpeklerde KKY gelişiminde oto-immun mekanizmaların da patogenezisde aktive edilebileceğini düşündürmektedir.

Sunulan çalışmada C sınıfı hastalarda kontrol grubuna göre serum PEDF düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. PEDF'nin damar duvarı ve trombositlerdeki anti-inflamatuar, antioksidan ve antitrombotik etki ile koroner kalp hastalığı, miyokard enfarktüsü ve aterosklerozda koruyucu bir rol üstlenmesi; C sınıfı hastalardaki bu azalmanın koruyucu mekanizmaları zayıflatabileceğini ve bunun da ilgili proteinin aşırı kullanımından ileri gelebileceğini düşündürmüştür. Rychli et al. (2010) insanlarda yaptıkları bir çalışmada kardiyak miyosit ve fibroblast apoptozunu indükleyerek oluşturulan kalp yetmezliğinde PEDF'in rolünü incelemişler; klinik veriler doğrultusunda PEDF konsantrasyonlarının serum BNP'ye ek olarak kalp yetmezliği prognozunun değerli bir biyobelirteci olabileceği sonucuna varmışlardır. Ratlarda yapılan bir çalışmada miyokardiyal

enfarktöslü hastalarda PEDF düzeyinin haftalar geçtikçe azalması (Ueda, Yamagishi, Matsui, Jinnouchi, & Imaizumi, 2011), bu çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara benzerlik göstermiş; kalp yetmezliği kronikleştikçe bu protein düzeyinde azalma olabileceği kanısını kuvvetlendirmiştir.

Sunulan çalışmada C ve D sınıflarında yani semptomatik KKY'li köpeklerde sağlıklı kontrollere göre serum actin cytoplasmic-1 (ACTB) düzeyleri azalmıştır. Uniprot verilerine göre ACTB kalbin enerji metabolizmasında aktif olarak görev alan proteinlerden biri olarak tanımlanmaktadır. Kalp yetmezlikli hastalarda adenosin trifostat (ATP) rezervleri azalırken kasılma için gerekli enerji ihtiyacı artmakta ve bu durum aritmi, iskemi gibi durumlara olan duyarlılığı arttırmaktadır (Ingwall, 2009). Bu nedenle bu çalışmamızda ileri kalp yetmezliğinde serum ACTB miktarının azalması; miyokardiyal doku tarafından kullanılan ATP miktarının azalmasına, miyositlerde enerji açığının ortaya çıkması ile de KKY'nin ilerlemesine katkı verebilir görülmektedir.

Serum apolipoprotein C-II (ApoC-II) bu çalışmada C sınıfı hastalarda azalan bir diğer protein olmuştur. ApoC-II şilomikronların, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) bir bileşenidir (Kei, Filippatos, Tsimihodimos, & Elisaf, 2012). Bu çalışmada serum ApoC-II düzeyinin azalması; lipoprotein lipase (LPL) aktivitesinin azalması ve lipid metabolizmasının bozulması ile kardiyovasküler risklerin artması ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgumuza paralel olarak Kocatürk ve diğerleri (2016) de serum ApoC-II ekspresyonunun DCM'li köpeklerde azaldığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda hemopexin'in (HPX) C sınıfı hastalarda kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. HPX'in doğrudan endotelial duvar üzerinde etkili olan ve NO'yu etkisiz hale getirerek vasküler fonksiyonu bozan serbest *heme* aracılı ROS üretimini önlemesi, bu çalışmada HPX'in anti-oksidan olarak aşırı kullanılması ile serum düzeylerindeki düşmeyi açıklayabilir. Deney hayvanı çalışmalarında HPX tedavisi ile kardiyovasküler fonksiyonların korunma stratejisi de (Vinci et al., 2013) bu düşüncemizi destekler niteliktedir. HPX düzeyi azaldığında kalpte biriken serbest *heme*'in sistolik disfonksiyonu arttırması, oksidatif stres ile birlikte anti-oksidan N-Acetyl-L-sistein

etkinliğinin de sınırlanması; HPX'in kalbi koruyucu mekanizmalardaki kompleks patofizyolojik rolünü yansıtmaktadır (Ingoglia et al., 2017). Çalışma sonuçlarımız *heme* gibi toksik ürünlerin ve ROS'ların uzaklaştırılması sürecinde HPX'in aşırı tüketilebileceğini, bu durumun da kalp fonksiyonlarını bozabileceğini düşündürmüştür. Bu bilgilerin HPX düzeyini yükselten böylece ROS birikimini ve kalpteki antioksidan genlerin indüksiyonunu önleyecek tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için önemli bir altyapı oluşturduğu söylenebilir.

5.5.3. D Sınıfı Protein İfade Farklılıkları

Bu çalışmada D sınıfı hastaların serumlarında 2 proteinde (NUMA1 ve LBP) artma, 10 proteinde ise; paraoxonase/arylesterase-1 (PON1), serum albumin precursor (Pre-ALB), serum albumin isoform X1 (ALB), platelet basic protein precursor (PPBP), fetuin-B (FETUB), adiponectin isoform X2, ACTB, tetranectin (TN), immunoglobulin lambda-1 light chain isoform X38 (IGLC1) ve AGT değerlerinde azalma belirlenmiştir. Bu grupta artan serum proteinlerinden LPB'nin B2 hastalarında azalması, NUMA1'in ise C sınıfı hastalarda artması; D sınıfı hastalarda sırasıyla akut faz yanıtı (Lepper et al., 2011; Asada et al., 2019) ve oto-immunite aktivasyonunun (Szalat et al., 2010) göstergeleri olarak değerlendirilmiştir.

Azalan proteinler irdelendiğinde PON1'in HDL kolesterolü oksidatif stresten koruyan bir enzim olduğu görülmektedir. Köpeklerde endotoksemi modelinde (Tvarijonaviciute et al., 2012) ve akut pankreatitiste (Tvarijonaviciute et al., 2015) serum PON-1 düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada da serum PON1 düzeyinin kontrole göre düşük belirlenmesi; PON1'in negatif APP olabileceğini öneren çalışma bulgularını (Tvarijonaviciute et al., 2012 ve 2015) destekler niteliktedir. Düşük serum PON-1 aktivitesi, insanlarda aterosklerotik kalp hastalığında olduğu gibi (Dursun, Demirtaş, Bayrak, & Yaralı, 2006) bu çalışmada ki D sınıfı köpeklerde de ek bir risk faktörü olarak düşünülmüştür. Buna paralel olarak sistolik kalp yetmezlikli insanlarda serum PON-1'deki azalmanın uzun vadede kardiyak hastalık riskini yükselttiği ileri sürülmüştür (Tang et al., 2011). Mahadesh Prasad et al. (2014) DCM'li olup NYHA fonksiyonel sınıflandırmasına göre 4 gruba ayrılan köpeklerde, serum PON1 seviyesinin hastalığın

şiddeti ile paralel azaldığını gözlemişlerdir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada D sınıfındaki hastalarda gözlenen düşük PON1 seviyesinin, kalp yetmezliğinin progresyonunda antioksidan kapasite azalmasına yol açabileceği, bu nedenle de oksidatif stresi önleyen ya da azaltan yaklaşımlarının KKY profilaksi ve tedavisinde değerli olabileceği kanısına varılmıştır.

İnsanlarda hipoalbuminemi kalp yetmezliğinde yaygın bir bulgu olup, artan yaş ve hastalık şiddeti ile uyumlu görülmektedir. Bu çalışmamızda D sınıfı hastalarda serum albüminde kontrole göre (ortalama 3.7 gr/dL) istatistiksel düzeyde olmayan bir azalma belirlenmiş (ortalama 2.9 mg/dL), ancak albümin prekürsör düzeyi önemli ölçüde düşük tespit edilmiştir. Albuminin karaciğerde öncelikli olarak prekürsör proteinden üretildiği ve sonra dolaşıma salındığı bilindiğinden (Weigand, & Alpert, 1981), D sınıfı hastalarda henüz hipoalbuminemi oluşturacak düzeyde bir yetersizlik olmadığı söylenebilir. Hipoalbumineminin kaşeksi, inflamasyon, malnütrisyon, hemodilüzyon, karaciğer yetmezliği, protein kayıplı enteropati ve nefrotik sendromdan kaynaklandığı bilinmektedir (Hanson et al., 2018). Bu nedenle KKY'li köpeklerde özellikle D sınıfı hastalarda serum albümin düzeylerinin irdelenmesi; tanı ve tedavi aşamasında eksiklerin giderilmesi ve iyileşme sürecine katkı verilmesi açısından önemli görülmektedir (Arques, & Ambrosi, 2011). Pre-albumin'in son zamanlarda transthyretin (TTR) olarak da adlandırılması ve bu proteinin dolaşımında tiroksin hormonu ve retinol binding proteinin taşıyıcısı olarak görev alması (Hanson et al., 2018); D sınıfı hastalarda albumin prekürsörünün görününden daha kapsamlı roller üstlendiğini düşündürmektedir. Bu düşüncemiz Hanson et al. (2018)'in insanlarda düşük serum TTR değerinin kardiyak fonksiyon bozulması ve kötü prognoz ile ilgili olabileceğini önerdikleri çalışma bulguları ile desteklenir niteliktedir. Bununla birlikte D sınıfı hastalarda bir negatif APP olarak pre-albumin (TTR) düzeyinde saptadığımız bu azalma; KKY'de akut faz yanıtı ve inflamasyon varlığını desteklemektedir (Johnson et al., 2007).

Uniprot gen verileri tetranektin'in (TN) moleküler olarak Ca iyonu, karbonhidrat ve heparini bağladığını, kemik mineralizasyonunda, büyüme faktörünün dönüşümünde, plateletlerin degranulasyonunda ve plazminojen aktivasyonunda görev aldığını

göstermektedir. Sunulan çalışmada D sınıfı hastalarda kontrol grubuna göre TN düzeyinin azaldığı gözlenmiş, bu tespit; koroner arter hastalığı olan insanlarda hasarlı damar sayısı arttıkça serum TN seviyesinin de azaldığını bildiren çalışmaya benzerlik göstermiştir (Chen et al., 2015). TN'nin akut myokardiyal infarktüsli hastalarda serum düzeyinin azalması ileri kalp yetmezliği olan köpeklerdeki çalışma bulgularımızı destekler niteliktedir (Kamper et al., 1998). Diğer taraftan TN fibrinolizisin regülatörü olarak tanımlansa da (Kamper et al., 1998) çalışmamızda fibrinolizisin göstergesi olan serum d-dimer düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. Her ne kadar bu çalışmamızda köpeklerde KKY sürecinde olası arterosklerozis gibi damar hasarlarını belirleme şansımız, imkanımız ve planımız olmamakla birlikte bu bulgularımız hali hazırda insan ve ileride bu konuda yapılacak köpek çalışmalarına bir alt yapı oluşturabilir düşüncesindeyiz. Bu konuda Edgar et al. (2019)'ın serum TN'yi kalp yetmezlikli insanlarda azalması temelinde tanı ve monitorizasyon için umut verici yeni bir biyobelirteç olarak önermeleri, köpek çalışmaları için yeni bir bakış açısı oluşturmuştur.

Sunulan çalışmada D sınıfı hastalarda serum adiponektin seviyesinin kontrollere göre istatistiksel düzeyde düşük çıkması, bu proteinin negatif APP davranışları ile uyumlu bulunmuştur (Tvarijonaviçute et al., 2011). Kules et al. (2020)'ın şiddetli klinik seyir gösteren CVHD'li köpeklerde adiponektin düzeyini azalmış olarak tespit etmeleri D sınıfı hastalarda elde ettiğimiz bulgulara paralellik göstermiştir. Bu bulgumuza tezat oluşturacak şekilde, bazı insan (Kistorp et al., 2005; George et al., 2006) ve köpek çalışmalarında (Damoiseaux et al., 2014; Kim et al., 2016) KKY'li hastalarda serum adiponektin seviyesinin yükseldiği, hatta bu değişimlerin prognoz ve mortalite tahmini için kullanılabilirliği ifade edilmiştir. Çalışmalar adiponektinin glukoz metabolizması, kronik inflamasyon, apoptosis, oksidatif stres ve arterosklerotik proseslerde yararlı olduğunu göstermektedir (Menzaghi, & Trischitta, 2018). Dolayısıyla bu çalışmada adiponektin düzeylerinde ki azalmada inflamasyon ve oksidatif stres kontrolü için aşırı kullanımının etkili olabileceği düşünülmüştür. Adiponektin anti-inflamatuar etkisini inflamatuvar sitokinleri (IL-8, TNF- α ve MCP-1) baskılayarak, anti-inflamatuar sitokin IL-10 ekspresyonunu da artırarak göstermektedir (Menzaghi, & Trischitta, 2018).

Düşük adiponektin düzeyinin insanlarda (Kistorp et al., 2005) ve köpeklerde (Kim et al., 2016) kardiyovaskular hastalıklar için önemli bir risk faktörü olarak görülmesi, D sınıfı hastalarda belirlediğimiz bu azalmanın kötü prognoz göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan serum adiponektin yanıtlarının insan ve köpeklerde kalp hastalıklarında farklı yönde tespit edilmesinde tür farklılığının da rol oynayabileceği hatırlanmalıdır (Nelson et al., 2017).

Fetuin; sistatin süper ailesinin bir üyesi olarak osteogenez ve kemik rezorpsiyonu, insülin ve hepatosit büyüme faktörü reseptörlerinin düzenlenmesi ve sistemik inflamasyon olmak üzere bir çok reaksiyon ve metabolik faaliyette rol oynamaktadır. Fetuin ailesi karaciğer tarafından üretilen fetuin-A ve -B olmak üzere iki önemli proteinden oluşurken, bunların fertilizasyondaki görevlerinden de bahsedilmektedir (Dietzel et al., 2013). Protein alt tipleri farklı olmakla birlikte, çalışmamız D sınıfı hastalarda serum fetuin-B düzeyinin azaldığını gösterirken, insanlarda sistolik kalp yetmezliğinde serum fetuin-A düzeyinin azaldığı belirlenmiştir (Keçebaç ve diğerleri, 2014). Diğer taraftan akut miyokard enfarktüsü insanlarda serum fetuin-B ekspresyonunun artması (Jung et al., 2015), çalışmamıza tezat oluşturmuştur. Zhu et al. (2017) yüksek fetuin düzeylerinin koroner arter hastalığı için potansiyel bir biyobelirteç görevi görebileceğini ileri sürmüşlerdir. Sunulan çalışmada serum fetuin-B düzeyindeki azalmanın KKY sürecinde inflamasyon ve akut faz reaksiyonunun aktivasyonu ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Olivier et al. (2000)'ın ratlarda deneysel inflamasyona yanıt olarak meydana gelen akut faz reaksiyonunda fetuin-B mRNA düzeylerinde azalma belirlemeleri bu düşüncemizi destekler niteliktedir. Fetuin ailesinin patolojik mineralizasyonu inhibe edebilme potansiyeli kemik gelişimi ve osteogenesis için önemli olmakla birlikte (Dietzel et al., 2013) azalan serum düzeylerinin kalp kapakçıklarında kalsifikasyon riskini artırabileceği de düşünülmelidir.

Platelet basic protein (PBP); prekürsör protein pro-PBP (PPBP)'den üretilmekte ve CXC kemokin ailesinin bir üyesi olarak plateletlerin öncelikli granular bir proteini olarak kabul edilmektedir. PPBP ve derivatlarının katyonik antimikrobiyal peptidlere sahip olduğu ve bir çok mantar ve bakteriyi öldürebileceği belirlenmiştir (El-Gedaily,

Schoedon, Schneeman, & Schaffner, 2004). PPBP'nin derivatlarındaki çeşitlilik (connective tissue activating peptide III, thrombocidin 2, β -thromboglobulin, neutrophil activating peptide - 2 ve thrombocidin - 1) düşünüldüğünde; PPBP fonksiyonlarının kompleks ve multifonksiyonel olduğu öngörülebilir. Bu çalışmada serum PPBP düzeyinde saptadığımız azalma mononükleer fagosit sistemin aktive edilmesi ve antimikrobial etkinliğinden dolayı aşırı kullanılmasıyla ilgili olabilir (El-Gedaily et al., 2004). Bazı interlökinlerin (IL-4 ve -10) ve glukokortikoidlerin PPBP'nin monositlerdeki mRNA seviyelerini ve serum düzeylerini düşürmesi (El-Gedaily et al., 2004); bu proteinin yangısal reaksiyonlarda (fizyolojik ve/veya patolojik stres koşullarında) olası rolünü göstermiştir. Bu çalışmamızda ileri kalp yetmezliği grubunda PPBP'nin negatif bir APP gibi davrandığı düşünülmüştür.

İmmüoglobulin lambda-1 light chain isoform X38 (IGLC1) immüoglobulin ailesinin bir üyesi olmakla birlikte insan ve köpeklerde bu protein ile ilgili yeterli çalışmaya rastlanmamıştır. Hatalı yönde değişim (misfolding) gösteren proteinler nedeni ile protein homeostasisi bozulmakta, bu durum sonunda yüksek morbitide ve zayıf prognozla karakterize kalp hastalığına yol açabilmektedir. Bu proteinler miyokardiyumdan köken olabileceği gibi IGLC1 gibi eksternal yapılardan da kaynaklanmaktadır (Ha et al., 2014). Mevcut bilgiler mitral darlığı olan insanlarda IGLC1 düzeyindeki azalmayı immün sistemin bir yanıtı olarak göstermektedir (Mukherjee et al., 2014). Bu nedenle bu çalışmada serum düzeyi azalan IGLC1'in D sınıfı hastalarda immün supresif sonuçlar doğurabileceği düşünülmüştür. Normal bireylerde immüoglobulin kappa ve lamda oranı 2:1 olarak tanımlanmışken (Gertz, Lacy, & Dispenzieri 2002), ileri kalp yetmezlikli hastalarımızda IGLC1 deki bu azalmanın her ne kadar köpeklerdeki oran henüz bilinmiyor olsa da bir dengesizlik yaratacağı ve immünolojik fonksiyonları değiştirebileceği aşikardır. Bazı araştırmalarda (Ha et al., 2014; Gertz et al., 2002) renal amiloidosis ile IGLC arasında bağlantı kurulması, KKY'li köpeklerde bu proteinin patofizyolojide oynayabileceği rolleri çeşitlendirmektedir.

D sınıfı hastalarda azalan diğer proteinler; ACTB ve AGT'dir. Bu proteinlerden ACTB'nin azalması C sınıfı hastalarda olduğu gibi ileri kalp yetmezliği olan köpeklerde

de artan miyokardiyal enerji ihtiyacı karşılanırken aşırı tüketilme olasılığı ile ilişkilendirilmiştir. Serum AGT'nin D sınıfı hastalarda kontrole göre düşük belirlenmesinde; bu gruptaki hastaların refraktör kalp yetmezliği olarak tanımlanması ve geçmişlerinde ACE inhibitörleri gibi sempatik aktiviteyi sınırlandıran ilaç kullanımları etkili olabilir.

5.5.4. Tedavinin Serum Proteomlarına Etkisi

Bu çalışmada sadece C sınıfı hastalar tedavi öncesi ve sonrası değerlendirmeler için kullanılmış, bu yaklaşımla bu grupta son zamanlarda kardiyak medikasyon almamış hastalar üzerinden ilaçların proteinler üzerine olası etkileri ortadan kaldırılmıştır. D sınıfı hastaların tedavi alan ve bu tedaviye rağmen nüks eden (refraktör) hastalar olması, C sınıfı hastaların bu amaç için tercih edilmesine yol açmıştır. Tedavi sonrası değerlerde toplam 9 proteinde istatistiksel düzeyde değişim belirlenmiştir. Tedavi ile birlikte iki proteinin (complement C3 ve CPN1) serum düzeyleri artarken yedi proteinin ise (ACTB, fetuin-B, IGLC1, complement factor H, AGT, serum albumin precursor ve serum albumin isoform X1) azalmıştır.

Serum komplement C3 düzeyi yüksek olan sistolik kalp yetmezlikli hastaların, serum düzeyi düşük olan hastalara göre daha uzun sağ kalım sürelerine sahip olmaları ve LV-EF değeri yükselirken serum NTpro-BNP değerinin düşmesi (Frey et al., 2013), bu çalışmada tedavi sonrasında bu proteinde saptadığımız artmayı yaşam süresi ve kalitesi (prognoz) açısından elverişli hale getirmiştir. Tedavi ile birlikte serum CPN1 düzeyindeki artma (Chen et al., 2020); kalpteki hemodinamik stresin korunması ve idamesi için olumlu bir yanıt olarak değerlendirilmiştir.

Tedavi ile birlikte hastaların klinik ve diğer tanısal unsurlar (kan sayımı, biyokimya, EKG, röntgen ve ekokardiyografi) temelinde daha iyi duruma gelmesinde artan proteinler kadar azalan proteinlerin de katkısı olabilir. Bu süreçte azalan bazı proteinlerin (fetuin-B, AGT, IGLC1, albumin precursor ve albumin isoform X1) hali hazırda nüks (refraktör) hastası olarak tanımlanan D sınıfı hastalarda da azalmış olması;

her iki grupta da tedavi ile birlikte olası değişimleri düşündürmüştür. Tedaviye rağmen proteinlerin moleküler ve biyolojik rollerine göre immünolojik reaksiyonların (fetuin-B, IGLC1, complement C3) ve karaciğerden albümin üretiminin (serum albumin precursor ve isoform X1) olumsuz etkilenebileceği söylenebilir. Bu değişimlerin inflamatuvar süreci tetikleyen veya devam ettiren bir durumun göstergesi mi ya da anti-inflamatuvar reaksiyonların bir parçası mı olduğunun ortaya konabilmesi için moleküler düzeyde daha kapsamlı ve detaylı çalışmalarla ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada *canis lupus familiaris* protein veri bankasına göre tanımlanan tüm proteinler ve bu proteinlerin birbiri ile olan ilişkisi string analizi ile irdelendiğinde komplement sistemin kendi arasında (C1, C2 ve C4), fetuin, serpin ve hemopexinin ise diğer proteinlerle olan moleküler ve biyolojik ilişkisi dikkat çekici bulunmuştur. Dolayısıyla proteinlerin bireysel ve/veya diğer protein ve protein grupları ile etkileşimde olması; KKY patogenezinin kompleks yapısını ortaya koymaktadır. Chen et al. (2020) hemopeksin ve serpin düzeylerindeki değişimlerin düzenlenmesi ile diyabetli hastalarda yara iyileşmesinde olumlu katkılar almaları, bu çalışmada protein – protein etkileşimlerinin düzenlenmesinin KKY tedavisi için iyi bir örnek oluşturmaktadır.

5.6. Çalışmayı sınırlandıran faktörler

Bu çalışmada bazı sınırlayıcı (study limitation) faktörler söz konusudur. İlk olarak örneklem sayısı düşük ve çalışma grupları farklı hastalıklara (MMVD ve DCM) göre alt gruplar şeklinde organize edilmemiştir. Bu durum; belirli bir sürede projenin tamamlanması gerektiğinden bir hastalığa (MMVD / DCM) ya da her iki hastalığa ait yeterli sayıda hasta materyali bulunamamasından kaynaklanmıştır. Bu yaklaşım her ne kadar dezavantaj yaratır gibi görünse de bu şekilde köpeklerde KKY’de karma hasta popülasyonu ile yapılan çalışmaların varlığı da dikkat çekmiştir (Petric et al., 2018; Damoiseaux et al., 2014). Bu nedenle bu çalışma bir pilot çalışma olarak düşünölmelidir. İleride daha fazla sayıda ve aynı hastalığa (MMVD veya DCM) sahip örneklerin olduğu ek çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

İkinci olarak çalışmaya dahil edilen köpeklerin canlı ağırlık ve ırk çeşitliğinin olmasıdır. Zira, her iki parametrenin de bir çok ekokardiyografik ölçümü (LA ve LV çapları, LVIDDn ve EPSS değerleri gibi) etkilediği bilinmektedir (Boon, 2011). Canlı ağırlıkla ilgili olarak gruplar arasında istatistiksel bir fark olmamasına rağmen mevcut farklılıklar dahi LVIDd değerlerini etkileyebilir; bu nedenle bu çalışmada ırk ve canlı ağırlığa göre varyasyonların olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için LVIDd ile inflamatuvar, oksidatif stres ve kardiyak hasar biobelirteçleri arasında korelasyon çalışmaları yapılmıştır. Ekokardiyografik LA/Ao oranı LA dilatasyonunun bir göstergesi olup kalp yetmezliğinin şiddeti ile pozitif korelasyon göstermektedir (Han et al., 2018; Hansson et al., 2002). LVIDDn (allometrik M-mode ölçümü) köpeklerde LV dilatasyonu ve şiddetinin değerlendirilmesi için öncelikli bir parametre olarak önerilmektedir (Cornell et al., 2004). Bu nedenle bu çalışmada olası sınırlayıcı faktörleri ortadan kaldırabilmek ve ekokardiyografik kardiyak yeniden şekillenmeyi tanımlayabilmek için LVDDn değerleri kullanılmıştır.

Bir diğer sınırlayıcı faktör kontrol grubunu oluşturan köpek yaşlarının hasta gruplarının değerleriyle birebir eşleştirilememesidir. Buna rağmen sunulan bu çalışmada seçilen köpeklerin yaş ortalamaları (sağlıklı kontroller için 3.5 yaş, B2 sınıfı için 6.0 yaş, C sınıfı için 8.6 yaş ve D sınıfı için 9.1 yaş) Reimann et al. (2017)'in çalışmasında kullandığı köpeklerin yaş ortalamalarına benzerlik göstermiştir. Bunlarla birlikte cinsiyet ve canlı ağırlık farklılığının serum sitokin ölçümlerine önemli bir etki yapmadığı da belirtilmiştir (Zois et al., 2012).

5.7. Sonuç

Bu çalışma verileri aşağıda belirlediğimiz sonuçları ortaya çıkartmıştır:

1- Kalp hastalıklarının tanı aşamasında klinik muayene disiplininin uzaklaşmaması, özellikle röntgen ile kardiyomegali şüphesi veya varlığında mutlaka ekokardiyografik değerlendirme ile hastalardaki olası kalp patolojilerinin belirlenmesi gerektiği,

- 2- Laboratuvar çalışmasında nötrofilik lökositosis gibi değişimlerin kalp yetmezliğinin altyapısında bulunan kronik inflamasyonu gösterebileceği, ancak ACVIM'e göre kalp yetmezliği sınıflandırmasına katkı veremeyeceği,
- 3- Akut faz yanıtı proteinlerinden özellikle CRP artışı ve PON1 azalmasının kalp yetmezliğinde patofizyolojisinde rolü olabileceği ve bu değişimlerin B2 ve D sınıfı kalp yetmezliğinin tanımlanmasında yararlı olabileceği,
- 4- Sitokin paneli (IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, IP-10, MCP-1, GM-CSF, KC-like, TNF- α ve IFN- γ) irdelendiğinde bu 13 sitokin içerisinde sadece keratinosit derive kemokinin (KC-like) bir inflamasyon indikatörü olarak gruplar arasında anlamlı değişim gösterdiği (arttığı) ve kalp yetmezliklerinin ayırımında kullanılabileceği,
- 5- Kalp yetmezliğinin özellikle ileri safhasında (ACVIM'e göre D sınıfı) anti-oksidan parametrelerde (CUPRAC, TEAC ve Thiol) bir azalma olduğu; bunun da tanı ve tedavi aşamasında hekimlere katkı sağlayabileceği,
- 6- Serum proteomik analizlerle toplam 157 proteom belirlenmiş, bunlardan istatistiksel düzeyde A sınıfına göre B2 sınıfında toplam 4, C sınıfında 16, D sınıfında da 12 proteinin değişim (artan ya da azalan) gösterdiği,
- 7- Serum proteomik analizlerin; proteinlerin farklı gruplarda azalan ya da artan değişimleri ile ACVIM'e göre kalp yetmezliği sınıflandırmasına ve hastalığın progresyonunda rol alabilecek proteinlerin belirlenmesine katkı verebileceği,
- 8- Proteomik analizlerde azalma ya da artma eğiliminde olan proteinlerin inflamasyon süreci ile ilgili olarak negatif ya da pozitif akut faz yanıtı proteini gibi davrandıkları,
- 9- Tedavi ile birlikte bazı proteinlerin (C3 ve CPN1) artarken, bazılarının ise azalabileceği (ACTB, fetuin-B, IGLC1, complement factor H, AGT, serum albumin precursor ve isoform X1); bu nedenle tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde adı geçen proteinlerin rolü olabileceği ve
- 10 – Bu çalışma ile tedavi aşamasında özellikle inflamatuvar (KC-like) ve anti-oksidan (CUPRAC, TEAC ve Thiol) parametrelerin, akut faz proteinleri (CRP ve PON1) ve serum proteom değişimlerini kontrol altına alabilecek yaklaşımların iyileşme sürecine katkı verebileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Aderka, D., Le, J. M., & Vilcek, J. (1989). IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *The Journal of Immunology*, 143(11), 3517-3523.
- Adin, D., DeFrancesco, T. C., Keene, B., Tou, S., Meurs, K., Atkins, C., ... & Saker, K. (2019). Echocardiographic phenotype of canine dilated cardiomyopathy differs based on diet type. *Journal of Veterinary Cardiology*, 21, 1-9. DOI: 10.1016/j.jvc.2018.11.002.
- Ahmed, M. S., Jadhav, A. B., Hassan, A., & Meng, Q. H. (2012). Acute phase reactants as novel predictors of cardiovascular disease. *ISRN inflammation*, 2012. DOI:10.5402/2012/953461
- Alonso-Martinez, J. L., Llorente-Diez, B., Echegaray-Agara, M., Olaz-Preciado, F., Urbietta-Echezarreta, M., & González-Arencibia, C. (2002). C-reactive protein as a predictor of improvement and readmission in heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 4(3), 331-336. DOI:10.1016/s1388-9842(02)00021-1
- Alvarez, A. M., & Mukherjee, D. (2011). Liver abnormalities in cardiac diseases and heart failure. *The International journal of angiology: official publication of the International College of Angiology, Inc*, 20(3), 135. DOI: 10.1055/s-0031-1284434
- Amado, F. M., Ferreira, R. P., & Vitorino, R. (2013). One decade of salivary proteomics: current approaches and outstanding challenges. *Clinical Biochemistry*, 46(6), 506-517. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.10.024
- Anderson, J. L., Maycock, C. A. A., Lappé, D. L., Crandall, B. G., Horne, B. D., Bair, T. L., ... & Intermountain Heart Collaborative Study Group. (2004). Frequency of elevation of C-reactive protein in atrial fibrillation. *The American Journal of Cardiology*, 94(10), 1255-1259. DOI:10.1016/j.amjcard.2004.07.108
- Arques, S., & Ambrosi, P. (2011). Human serum albumin in the clinical syndrome of heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, 17(6), 451-458. DOI: 10.1016/j.cardfail.2011.02.010. Epub 2011 Apr 22. PMID: 21624732.
- Asada, M., Oishi, E., Sakata, S., Hata, J., Yoshida, D., Honda, T., ... & Murayama, N. (2019). Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein Levels and the Incidence of Cardiovascular Disease in a General Japanese Population: The Hisayama Study. *Journal of the American Heart Association*, 8(21), e013628. DOI: 10.1161/JAHA.119.013628.
- Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Haggstrom, J., ... & Stepien, R. (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1142-1150. DOI:10.1111/j.1939-1676.2009.0392.x
- Aukrust, P., Ueland, T., Lien, E., Bendtzen, K., Müller, F., Andreassen, A. K., ... & Frøland, S. S. (1999). Cytokine network in congestive heart failure secondary to

- ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *The American Journal of Cardiology*, 83(3), 376-382. DOI: 10.1016/S0002-9149(98)00872-8
- Aukrust, P., Ueland, T., Müller, F., Andreassen, A. K., Nordøy, I., Aas, H., ... & Gullestad, L. (1998). Elevated circulating levels of CC chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 97(12), 1136-1143. DOI: 10.1161/01.CIR.97.12.1136
- Aviles, R. J., Martin, D. O., Apperson-Hansen, C., Houghtaling, P. L., Rautaharju, P., Kronmal, R. A., ... & Chung, M. K. (2003). Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation*, 108(24), 3006-3010. DOI: 10.1161/01.cir.0000103131.70301.4f.
- Bakirel, U., & Gunes, S. (2009). Value of cardiac markers in dogs with chronic mitral valve disease. *Acta veterinaria*, 59(2-3), 223-229.
- Balligand, J. L., Ungureanu, D., Kelly, R. A., Kobzik, L., Pimental, D., Michel, T., & Smith, T. W. (1993). Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(5), 2314-2319.
- Baumann, H., & Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunology today*, 15(2), 74-80. DOI: 10.1016/0167-5699(94)90137-6.
- Beier, P., Reese, S., Holler, P. J., Simak, J., Tater, G., & Wess, G. (2015). The role of hypothyroidism in the etiology and progression of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(1), 141-149. DOI: 10.1111/jvim.12476
- Belch, J. J., Bridges, A. B., Scott, N., & Chopra, M. (1991). Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Heart*, 65(5), 245-248. DOI: 10.1136/hrt.65.5.245
- Blackstock, W. P., & Weir, M. P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, 17(3), 121-127. DOI: 10.1016/s0167-7799(98)01245-1.
- Bolignano, D., Basile, G., Parisi, P., Coppolino, G., Nicocia, G., & Buemi, M. (2009). Increased plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. *Rejuvenation Research*, 12(1), 7-14. DOI: 10.1089/rej.2008.0803
- Boon JA (2011) *Veterinary Echocardiography*, 2nd edition, Wiley-Blackwell Press, USA, pp: 25-556.
- Borgarelli, M., Abbott, J., Braz-Ruivo, L., Chiavegato, D., Crosara, S., Lamb, K., ... & Haggstrom, J. (2015). Prevalence and prognostic importance of pulmonary hypertension in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(2), 569-574. DOI: 10.1111/jvim.12564.
- Borgarelli, M., Santilli, R. A., Chiavegato, D., D'Agnolo, G., Zanatta, R., Mannelli, A., & Tarducci, A. (2006). Prognostic indicators for dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(1), 104-110. DOI: 10.1892/0891.6640.
- Boswood, A., Gordon, S. G., Häggström, J., Vanselow, M., Wess, G., Stepien, R. L., ... & Patteson, M. (2020). Temporal changes in clinical and radiographic variables in

- dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease: The EPIC study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. DOI: 10.1111/jvim.15753.
- Boswood, A., Häggström, J., Gordon, S. G., Wess, G., Stepien, R. L., Oyama, M. A., ... & Smith, S. (2016). Effect of pimobendan in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease and cardiomegaly: the EPIC study—a randomized clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(6), 1765-1779. DOI:10.1111/jvim.14586.
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., ... & Demay, M. (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews*, 29(6), 726-776.
- Bozkurt, B., Mann, D. L., & Deswal, A. (2010). Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 15(4), 331-341.
- Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C., & David, J. R. (1999). Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(2), 341-346. DOI:10.1084/jem.189.2.341.
- Brady, C. A., Hughes, D., & Drobatz, K. J. (2004). Association of hyponatremia and hyperglycemia with outcome in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 14(3), 177-182. DOI: 10.1111/j.1534-6935.2004.00118.x
- Brater, D. C., Chennavasin, P., Seiwell, R., & with the technical assistance of Joan Beck Dallas, Texas. (1980). Furosemide in patients with heart failure: Shift in dose-response curves. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 28(2), 182-186. DOI: 10.1038/clpt.1980.148.
- Braunwald, E. (2008). Biomarkers in heart failure. *New England Journal of Medicine*, 358(20), 2148-2159. DOI: 10.1056/nejmra0800239.
- Brewer, R., Wang, M., Zhang, K., Gupta, R., Rastogi, S., Paone, G., & Sabbah, H. N. (2012). A canine model of chronic heart failure and renal insufficiency (cardiorenal syndrome). *Journal of the American College of Cardiology*, 59(13S), E969-E969. DOI: 10.1016/S0735-1097
- Broschk, C., & Distl, O. (2005). Dilatative Kardiomyopathie (DCM) beim Hund: Pathologie, Klinik, Diagnostik und genetische Aspekte. DTW. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 112(10), 380-385.
- Bryant, D., Becker, L., Richardson, J., Shelton, J., Franco, F., Peshock, R., ... & Giroir, B. (1998). Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor- α . *Circulation*, 97(14), 1375-1381. DOI:10.1161/01.cir.97.14.1375.
- Buchanan, J. W., & Bücheler, J. (1995). Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *Journal-American Veterinary Medical Association*, 206, 194-194.
- Camacho, R. R., Carvalho, E. R., Pereira, E. Z., Gava, F. N., Camacho, A. A., & Sousa, M. G. (2017). Inflammatory profile in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Archives of Veterinary Science*, 22(4). DOI: 10.5380/avs.v22i4.56769.
- Carrera, M., Gallardo, J. M., Pascual, S., González, Á. F., & Medina, I. (2016). Protein

- biomarker discovery and fast monitoring for the identification and detection of Anisakids by parallel reaction monitoring (PRM) mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, 142, 130-137. DOI:10.1016/j.jprot.2016.05.012.
- Chatterjee, K., & Rame, J. E. (2008). Systolic heart failure: chronic and acute syndromes. *Critical Care Medicine*, 36(1), S44-S51. DOI: 10.1097/01.CCM.0000296267.84202.B0.
- Chen, L., Shan, Y., Yang, C., Sui, Z., Zhang, X., Zhang, L., & Zhang, Y. (2020). Carboxypeptidase B-assisted charge-based fractional diagonal chromatography for deep screening of C-terminome. *Analytical Chemistry*. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c00762
- Chen, M. C., Chang, J. P., Liu, W. H., Yang, C. H., Chen, Y. L., Tsai, T. H., ... & Pan, K. L. (2008). Increased inflammatory cell infiltration in the atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *The American Journal of Cardiology*, 102(7), 861-865. DOI:10.1016/j.amjcard.2008.05.038.
- Chen, R. F., Yang, M. Y., Wang, C. J., Wang, C. T., & Kuo, Y. R. (2020). Proteomic Analysis of Peri-Wounding Tissue Expressions in Extracorporeal Shock Wave Enhanced Diabetic Wound Healing in a Streptozotocin-Induced Diabetes Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5445.
- Chen, Y., Han, H., Yan, X., Ding, F., Su, X., Wang, H., ... & Jin, W. (2015). Tetranectin as a potential biomarker for stable coronary artery disease. *Scientific Reports*, 5, 17632.
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, 132, 19-27. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.10.010.
- Chung, M. K., Martin, D. O., Sprecher, D., Wazni, O., Kanderian, A., Carnes, C. A., ... & Van Wagoner, D. R. (2001). C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. *Circulation*, 104(24), 2886-2891. DOI:10.1161/hc4901.101760.
- Clark, D. J., Cleman, M. W., Pfau, S. E., Rollins, S. A., Ramahi, T. M., Mayer, C., ... & Setaro, J. F. (2001). Serum complement activation in congestive heart failure. *American Heart Journal*, 141(4), 684-690. DOI: 10.1067/mhj.2001.113758
- Collinson, P. O., Boa, F. G., & Gaze, D. C. (2001). Measurement of cardiac troponins. *Annals of Clinical Biochemistry*, 38(5), 423-449. DOI: 10.1177/000456320103800501.
- Cornell, C. C., Kittleson, M. D., Torre, P. D., Häggström, J., Lombard, C. W., Pedersen, H. D., ... & Wey, A. (2004). Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(3), 311-321. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2004.tb02551.x.
- Costa, C. M. D., dos Santos, R. C., & Lima, E. S. (2006). A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42(5), 345-350. DOI: 10.1590/S1676-24442006000500006.
- Crosara, S., Borgarelli, M., Perego, M., Häggström, J., La Rosa, G., Tarducci, A., & Santilli, R. A. (2010). Holter monitoring in 36 dogs with myxomatous mitral valve

- disease. *Australian Veterinary Journal*, 88(10), 386-392. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2010.00628.x. PMID: 20854294.
- Cunningham, S. M., Rush, J. E., & Freeman, L. M. (2012). Systemic inflammation and endothelial dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3), 547-557. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2012.00923.x.
- Cakiroglu, U., Akdam, H., Eryilmaz, U., Akgullu, C., Ozbek, O., Büyüköztürk, A. K., ... & Yenicierioglu, Y. (2018). The effect of hemodialysis on the body composition and cardiovascular disease markers in recently diagnosed end stage renal disease patients. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 64(4), 354-360.
- D'Souza, S. P., Davis, M., & Baxter, G. F. (2004). Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacology & therapeutics*, 101(2), 113-129. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2003.11.001.
- Damoiseaux, C., Merveille, A. C., Krafft, E., Da Costa, A. M., Gomart, S., Jaspers, P., ... & Mc Entee, K. (2014). Effect of physiological determinants and cardiac disease on plasma adiponectin concentrations in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(6), 1738-1745. DOI: 10.1111/jvim.12433
- Day MJ, Schultz RD (2014) *Veterinary Immunology Principles and Practice*, 2nd edition, CRC Press, Florida, 81-94.
- Del Ry, S., Cabiati, M., & Clerico, A. (2013). Recent advances on natriuretic peptide system: new promising therapeutic targets for the treatment of heart failure. *Pharmacological Research*, 76, 190-198. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.08.006.
- Deswal, A., Petersen, N. J., Feldman, A. M., Young, J. B., White, B. G., & Mann, D. L. (2001). Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation*, 103(16), 2055-2059. DOI: 10.1161/01.CIR.103.16.2055.
- Dietzel, E., Wessling, J., Floehr, J., Schäfer, C., Ensslen, S., Denecke, B., ... & Tropartz, T. (2013). Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. *Developmental Cell*, 25(1), 106-112. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.03.001. Epub 2013 Apr 4. PMID: 23562279.
- Dukes-McEwan, J., Borgarelli, M., Tidholm, A., Vollmar, A. C., Häggström, J., & ESVC Taskforce for Canine Dilated Cardiomyopathy. (2003). Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Cardiology*, 5(2), 7-19. DOI: 10.1016/S1760-2734(06)70047-9. PMID: 19081360.
- Dursun, P., Demirtaş, E., Bayrak, A., & Yarali, H. (2006). Decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity: an additional risk factor for atherosclerotic heart disease in patients with PCOS?. *Human Reproduction*, 21(1), 104-108. DOI: 10.1093/humrep/dei284
- Eckersall, P. D., Duthie, S., Safi, S., Moffatt, D., Horadagoda, N. U., Doyle, S., ... & Fitzpatrick, J. L. (1999). An automated biochemical assay for haptoglobin: prevention of interference from albumin. *Comparative Haematology International*, 9(3), 117-124.
- Edgar, K., Glezeva, N., Collier, P., Ledwidge, M., O'Reilly, J., Tea, I., ... & Watson, C. (2019). 62 Tetranectin expression is associated with myocardial fibrosis and may be

- a useful serum biomarker for indicating early myocardial injury and predisposition to heart failure development.
- El-Gedaily, A., Schoedon, G., Schneemann, M., & Schaffner, A. (2004). Constitutive and regulated expression of platelet basic protein in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(3), 495-503. DOI: 10.1189/jlb.0603288. Epub 2003 Dec 12. PMID: 14673015.
- Elkiran, E. T., Mar, N., Aygen, B., Gursu, F., Karaoglu, A., & Koca, S. (2007). Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer*, 7(1), 1-8. DOI: 10.1186/1471-2407-7-48.
- Eren, E., Ellidag, H. Y., Aydin, O., Kucukseymen, S., Giray, O., Aslan, S., & Yilmaz, N. (2015). The relationship between HDL-associated PON1 activity, oxidative stress and brain natriuretic peptide in NYHA functional class ii-iv heart failure patients. *Biomedical Research*, 26(3).
- Erez, A., Nagamani, S. C., Shchelochkov, O. A., Premkumar, M. H., Campeau, P. M., Chen, Y., ... & Black, J. O. (2011). Requirement of argininosuccinate lyase for systemic nitric oxide production. *Nature Medicine*, 17(12), 1619-1626.
- Eurich, D. T., Tsuyuki, R. T., Majumdar, S. R., McAlister, F. A., Lewanczuk, R., Shibata, M. C., & Johnson, J. A. (2009). Metformin treatment in diabetes and heart failure: when academic equipoise meets clinical reality. *Trials*, 10(1), 12. DOI: 10.1186/1745-6215-10-12
- Ferrari, A., Rodríguez, M. M., Power, P., Weill, F. S., De Simone, E. A., Gutkind, G., & Leoni, J. (2007). Immunobiological role of llama heavy-chain antibodies against a bacterial β -lactamase. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117(3-4), 173-182. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.03.003
- Fields, S. (2001). Proteomics in genoland. *Science*, 291(5507), 1221-1224. DOI:10.1126/science.291.5507.1221.
- Finkel, M. S., Oddis, C. V., Jacob, T. D., Watkins, S. C., Hattler, B. G., & Simmons, R. L. (1992). Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*, 257(5068), 387-389. DOI:10.1126/science.1631560.
- Fox P.R. (1999) Textbook of Canine and Feline Cardiology: Principles and Clinical Practice Hardcover – England: Saunders.
- Fox SI (2006) Human Physiology 9th Edition, McGraw-Hill Science, United States, 340-379.
- Freeman, L. M., Rush, J. E., Milbury, P. E., & Blumberg, J. B. (2005). Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(4), 537-541. DOI:10.1111/j.1939-1676.2005.tb02724.x.
- Frey, A., Kroiss, M., Berliner, D., Seifert, M., Allolio, B., Güder, G., ... & Fassnacht, M. (2013). Prognostic impact of subclinical thyroid dysfunction in heart failure. *International Journal of Cardiology*, 168(1), 300-305. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.064
- Fuentes, V. L. Does This Animal Have Congestive Heart Failure? World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, 2015.

- George, J., Patal, S., Wexler, D., Sharabi, Y., Peleg, E., Kamari, Y., ... & Roth, A. (2006). Circulating adiponectin concentrations in patients with congestive heart failure. *Heart*, 92(10), 1420-1424.
- Gertz, M. A., Lacy, M. Q., & Dispenzieri, A. (2002). Immunoglobulin light chain amyloidosis and the kidney. *Kidney International*, 61(1), 1-9. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00085.x. PMID: 11786079.
- Gheorghiade, M., & Ferguson, D. (1991). Digoxin. A neurohormonal modulator in heart failure?. *Circulation*, 84(5), 2181-2186. DOI: 10.1161/01.cir.84.5.2181.
- Ghiassi SR, Shirani D, Veshkiniand A, Bahonar A: Myxomatous Mitral Valve Disease in Dogs, 37 Cases (2010-2015). *EC Vet Science*, 4 (7), 2019, 473-481.
- Goutal, C. M., Keir, I., Kenney, S., Rush, J. E., & Freeman, L. M. (2010). Evaluation of acute congestive heart failure in dogs and cats: 145 cases (2007–2008). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(3), 330-337. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2010.00524.x
- Groenveld, H. F., Januzzi, J. L., Damman, K., van Wijngaarden, J., Hillege, H. L., van Veldhuisen, D. J., & van der Meer, P. (2008). Anemia and mortality in heart failure patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(10), 818-827. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.04.061.
- Guarnieri, C., Flamigni, F., & Caldarera, C. M. (1980). Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *Journal of molecular and Cellular Cardiology*, 12(8), 797-808. DOI: 10.1016/0022-2828(80)90081-4
- Guglielmini, C., Poser, H., Pria, A. D., Drigo, M., Mazzotta, E., Berlanda, M., & Luciani, A. (2013). Red blood cell distribution width in dogs with chronic degenerative valvular disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(6), 858-862. DOI: 10.2460/javma.243.6.858.
- Gulick, T., Chung, M. K., Pieper, S. J., Lange, L. G., & Schreiner, G. F. (1989). Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(17), 6753-6757. DOI:10.1073/pnas.86.17.6753.
- Gullestad, L., Ueland, T., Vinge, L. E., Finsen, A., Yndestad, A., & Aukrust, P. (2012). Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology*, 122(1), 23-35. DOI: 10.1159/000338166
- Ha, C. E., Bhagavan, N. V., Loscalzo, M., Chan, S. K., Nguyen, H. V., Rios, C. N., & Honda, S. A. (2014). Congestive Heart Failure: A Case of Protein Misfolding. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health*, 73(6), 172.
- Haagen, L., & Brock, A. (1992). A new automated method for phenotyping arylesterase (EC 3.1. 1.2) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *European Journal of Clinical chemistry and clinical biochemistry*, 30, 391-395.
- Han, D. H., Lee, D. G., & Jung, D. I. (2018). Echocardiographic evaluation of heart failure in dogs with myxomatous mitral valve disease: a retrospective study. *Journal of Biomedical and Translational Research*, 19(4), 79-85. DOI: 10.1016/j.cvsm.2004.05.002.

- Hanson, J. L., Arvanitis, M., Koch, C. M., Berk, J. L., Ruberg, F. L., Prokaeva, T., & Connors, L. H. (2018). Use of serum transthyretin as a prognostic indicator and predictor of outcome in cardiac amyloid disease associated with wild-type transthyretin. *Circulation: Heart Failure*, 11(2), e004000. DOI:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004000
- Hansson, K., Häggström, J., Kwart, C., & Lord, P. (2002). Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 43(6), 568-575. DOI: 10.1111/j.1740-8261.2002.tb01051.x.
- Hasenfuss, G. (1998). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular research*, 39(1), 60-76. DOI: 10.1016/S0008-6363(98)00110-2
- Heinrich, P. C., Castell, J. V., & Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical journal*, 265(3), 621-636. DOI: 10.1042/bj2650621.
- Herzum, I., & Renz, H. (2008). Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock. *Current Medicinal Chemistry*, 15(6), 581-587. DOI: 10.2174/092986708783769704
- Hill, M. F., & Singal, P. K. (1996). Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *The American Journal of Pathology*, 148(1), 291.
- Hochholzer, W., Morrow, D. A., & Giugliano, R. P. (2010). Novel biomarkers in cardiovascular disease: update 2010. *American Heart Journal*, 160(4), 583-594. DOI: 10.1016/j.ahj.2010.06.010.
- Holler, P. J., & Wess, G. (2014). Sphericity index and E-point-to-septal-separation (EPSS) to diagnose dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(1), 123-129. DOI: 10.1111/jvim.12242.
- Hu, M. L. (1994). Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*, 233, 380-385. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33044-1
- Iaizzo PA (2015) Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices. 3rd edition, Springer International Publishing, Switzerland, pp: 8-9
- Ingoglia, G., Sag, C. M., Rex, N., De Franceschi, L., Vinchi, F., Cimino, J., ... & Altruda, F. (2017). Hemopexin counteracts systolic dysfunction induced by heme-driven oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 452-464. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.003
- Ingwall, J. S. (2009). Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovascular research*, 81(3), 412-419. DOI: 10.1093/cvr/cvn301
- Iyer, S., Heublein, D., Benike, S., & Burnett, J. C. (2015). Urinary Angiotensinogen is Increased in Human Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*, 21(8), S28-S29. DOI: 10.1016/j.cardfail.2015.06.113.
- Jackson, C. E., Haig, C., Welsh, P., Dalzell, J. R., Tsorlalis, I. K., McConnachie, A., ... & Gardner, R. S. (2015). Combined free light chains are novel predictors of prognosis in heart failure. *JACC: Heart Failure*, 3(8), 618-625. DOI: 10.1016/j.jchf.2015.03.014. PMID: 26251088.

- Jackson, G., Gibbs, C. R., Davies, M. K., & Lip, G. Y. H. (2000). ABC of heart failure: Pathophysiology. *BMJ: British Medical Journal*, 320(7228), 167. DOI: 10.1136/bmj.320.7228.167.
- Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15(5), 755-766. DOI: 10.1016/0271-5317(95)00041-g.
- Janus, I., Kandefer-Gola, M., Ciaputa, R., Noszczyk-Nowak, A., Paśławska, U., Tursi, M., & Nowak, M. (2016). The immunohistochemical evaluation of selected markers in the left atrium of dogs with end-stage dilated cardiomyopathy and myxomatous mitral valve disease—a preliminary study. *Irish Veterinary Journal*, 69(1), 18. DOI:10.1186/s13620-016-0077-2.
- Jha, P., Jacobs, H., Bose, D., Wang, R., Yang, J., Light, R. B., & Mink, S. (1993). Effects of E. coli sepsis and myocardial depressant factor on interval-force relations in dog ventricle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 264(5), H1402-H1410. DOI:10.1152/ajpheart.1993.264.5.h1402.
- Jiang, C. F., Ng, K. W., Tan, S. W., Wu, C. S., Chen, H. C., Liang, C. T., & Chen, Y. H. (2002). Serum level of amylase and lipase in various stages of chronic renal insufficiency. *Zhonghua yi xue za zhi= Chinese Medical Journal; Free China ed*, 65(2), 49-54.
- Jiang, X., Bai, X. Y., Li, B., Li, Y., Xia, K., Wang, M., ... & Wu, H. (2019). Plasma Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chains H3 and H4 Serve as Novel Diagnostic Biomarkers in Human Colorectal Cancer. *Disease Markers*, 2019. DOI: 10.1155/2019/5069614. PMID: 31481982; PMCID: PMC6701429.
- Jocelyn, P. C. (1987). Spectrophotometric assay of thiols. *In Methods in Enzymology*, 143, pp. 44-67. DOI: 10.1016/0076-6879(87)43013-9.
- Johnson, A. M., Merlini, G., Sheldon, J., & Ichihara, K. (2007). Clinical indications for plasma protein assays: transthyretin (prealbumin) in inflammation and malnutrition: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC): IFCC Scientific Division Committee on Plasma Proteins (C-PP). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 45(3), 419-426. DOI: 10.1515/CCLM.2007.051. PMID: 17378745.
- Jung, S. H., Won, K. J., Lee, K. P., Kim, H. J., Seo, E. H., Lee, H. M., ... & Kim, B. (2015). The serum protein fetuin-B is involved in the development of acute myocardial infarction. *Clinical Science*, 129(1), 27-38. DOI: 10.1042/CS20140462
- Junming, L. E. (1987). Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.*, 56, 234-248.
- Kamper, E. F., Kopeikina, L., Mantas, A., Stefanadis, C., Toutouzas, P., & Stavridis, J. (1998). Tetranectin levels in patients with acute myocardial infarction and their alterations during thrombolytic treatment. *Annals of Clinical Biochemistry*, 35(3), 400-407. DOI: 10.1177/000456329803500309. PMID: 9635106.
- Karlapudi, S. K., Srikala, D., & Rao, D. S. (2012). Hypothyroidism-A cause for dilated cardiomyopathy in dogs; four year study (2008-2011). *Veterinary World*, 5(12). DOI: 10.5455/vetworld.2012.742-747
- Kashyap, R. S., Nayak, A. R., Deshpande, P. S., Kabra, D., Purohit, H. J., Taori, G. M., & Daginawala, H. F. (2009). Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 is a novel

- marker of acute ischemic stroke. *Clinica Chimica Acta*, 402(1-2), 160-163. DOI: 10.1016/j.cca.2009.01.009. PMID: 19263524.
- Keçebaş, M., Güllülü, S., Sağ, S., Beşli, F., Açıkgöz, E., Sarandöl, E., & Aydınlar, A. (2014). Serum fetuin-A levels in patients with systolic heart failure. *Acta Cardiologica*, 69(4), 399-405. DOI: 10.1080/ac.69.4.3036656. PMID: 25181915.
- Keene, B. W., Atkins, C. E., Bonagura, J. D., Fox, P. R., Häggström, J., Fuentes, V. L., ... & Uechi, M. (2019). ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1127-1140. DOI:10.1111/jvim.15488
- Kei, A. A., Filippatos, T. D., Tsimihodimos, V., & Elisaf, M. S. (2012). A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism*, 61(7), 906-921. DOI: 10.1016/j.metabol.2011.12.002
- Kemp, C. D., & Conte, J. V. (2012). The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Pathology*, 21(5), 365-371. DOI: 10.1016/j.carpath.2011.11.007.
- Kim, H. S., Kang, J. H., Jeung, E. B., & Yang, M. P. (2016). Serum concentrations of leptin and adiponectin in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(5), 1589-1600. DOI: 10.1111/jvim.14570.
- Kim, J. B., Hama, S., Hough, G., Navab, M., Fogelman, A. M., MacLellan, W. R., ... & Fonarow, G. C. (2013). Heart failure is associated with impaired anti-inflammatory and antioxidant properties of high-density lipoproteins. *The American Journal of Cardiology*, 112(11), 1770-1777. DOI: 10.1016/j.amjcard.2013.07.045.
- Kistorp, C., Faber, J., Galatius, S., Gustafsson, F., Frystyk, J., Flyvbjerg, A., & Hildebrandt, P. (2005). Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 112(12), 1756-1762. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.530972.
- Kocatürk, M., Baykal, A. T., Türkseven, Ş., Acioğlu, Ç., Agudelo, C. F., & Yılmaz, Z. (2016). Evaluation of serum and ascitic fluid proteomes in dogs with dilated cardiomyopathy. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22, 273-279. DOI: 10.9775/kvfd.2015.14429
- Konstam, M. A., Kramer, D. G., Patel, A. R., Maron, M. S., & Udelson, J. E. (2011). Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 4(1), 98-108. DOI:10.1016/j.jcmg.2010.10.008
- Kraus, M. S., Rassnick, K. M., Wakshlag, J. J., Gelzer, A. R. M., Waxman, A. S., Struble, A. M., & Refsal, K. (2014). Relation of vitamin D status to congestive heart failure and cardiovascular events in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(1), 109-115. DOI:10.1111/jvim.12239
- Kuleš, J., Bilić, P., Horvatić, A., Kovačević, A., Guillemin, N., Ljubić, B. B., ... & Eckersall, P. D. (2020). Serum proteome profiling in canine chronic valve disease using a TMT-based quantitative proteomics approach. *Journal of Proteomics*, 103825. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103825
- Kumar, A., Thota, V., Dee, L., Olson, J., Uretz, E., & Parrillo, J. E. (1996). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *Journal of Experimental*

- Medicine*, 183(3), 949-958. DOI:10.1084/jem.183.3.949
- Kumiega, E., Michałek, M., Kasztura, M., & Noszczyk-Nowak, A. (2020). Analysis of red blood cell parameters in dogs with various stages of degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Research*, 64(2), 325-332. DOI: <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0043>
- Langhorn, R., Oyama, M. A., King, L. G., Machen, M. C., Trafny, D. J., Thawley, V., ... & Kjelgaard-Hansen, M. (2013). Prognostic importance of myocardial injury in critically ill dogs with systemic inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(4), 895-903. DOI:10.1111/jvim.12105
- Lee, J. H., O'Keefe, J. H., Bell, D., Hensrud, D. D., & Holick, M. F. (2008). Vitamin D deficiency: an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor?. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(24), 1949-1956. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.08.050.
- Lepper, P. M., Kleber, M. E., Grammer, T. B., Hoffmann, K., Dietz, S., Winkelmann, B. R., ... & März, W. (2011). Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) is associated with total and cardiovascular mortality in individuals with or without stable coronary artery disease—results from the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study (LURIC). *Atherosclerosis*, 219(1), 291-297. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.001.
- Levent, P., Kocaturk, M., Akgun, E., Saril, A., Cevik, O., Baykal, A. T., ... & Yilmaz, Z. (2020). Platelet proteome changes in dogs with congestive heart failure. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1-13. DOI: 10.1186/s12917-020-02692.
- Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H. M., & Packer, M. (1990). Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *New England Journal of Medicine*, 323(4), 236-241. DOI:10.1056/nejm199007263230405.
- Li, Q., Heaney, A., Langenfeld-McCoy, N., Boler, B. V., & Laflamme, D. P. (2019). Dietary intervention reduces left atrial enlargement in dogs with early preclinical myxomatous mitral valve disease: a blinded randomized controlled study in 36 dogs. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 425. DOI: 10.1186/s12917-019-2169-1.
- Little, W. C., Kitzman, D. W., & Cheng, C. P. (2000). Diastolic dysfunction as a cause of exercise intolerance. *Heart Failure Reviews*, 5(4), 301-306.
- Locatelli, P., Giménez, C. S., Vega, M. U., Crottogini, A., & Belaich, M. N. (2019). Targeting the cardiomyocyte cell cycle for heart regeneration. *Current Drug Targets*, 20(2), 241-254. DOI: 10.2174/1389450119666180801122551
- Lu, H., Wu, C., Howatt, D. A., Balakrishnan, A., Moorleghen, J. J., Chen, X., ... & Feldman, D. L. (2016). Angiotensinogen exerts effects independent of angiotensin II. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(2), 256-265. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306740
- Mahadesh Prasad A.J., Krueger, M., & Krueger, M. (2014). Decreased level of serum paraoxonase (PON) activity in dogs with dilated cardiomyopathy (DCM). *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 6(9), 245-250. DOI: 10.5897/JVMAH2011.028
- Mak, S., & Newton, G. E. (2001). The oxidative stress hypothesis of congestive heart

- failure: radical thoughts. *Chest*, 120(6), 2035-2046. DOI: 10.1378/chest.120.6.2035
- Mandigers, P. (2005). Non-invasive blood pressure measurement in dogs and cats. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 130(7), 198-201.
- Martin, M. W. S., Stafford Johnson, M. J., & Celona, B. (2009). Canine dilated cardiomyopathy: a retrospective study of signalment, presentation and clinical findings in 369 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 50(1), 23-29. DOI:10.1111/j.1748-5827.2008.00659.x.
- Marty, C., Misset, B., Tamion, F., Fitting, C., Carlet, J., & Cavaillon, J. M. (1994). Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Critical Care Medicine*, 22(4), 673-679.
- Matsumori, A., Shimada, T., Nakatani, E., Shimada, M., Tracy, S., Chapman, N. M., ... & Mason, J. W. (2020). Immunoglobulin free light chains as an inflammatory biomarker of heart failure with myocarditis. *Clinical Immunology*, 108455. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108455. Epub 2020 May 30. PMID: 32479987.
- Mavropoulou, A., Guazzetti, S., Borghetti, P., De Angelis, E., & Quintavalla, C. (2016). Cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with mitral valve disease. *The Veterinary Journal*, 211, 45-51. DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.03.002. Epub 2016 Mar 8. PMID: 27033593.
- Mehta, A., Brasileiro, A. C., Souza, D. S., Romano, E., Campos, M. A., Grossi-de-Sá, M. F., ... & Rocha, T. L. (2008). Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us?. *The FEBS Journal*, 275(15), 3731-3746. DOI:10.1111/j.1742-4658.2008.06528.x
- Menzaghi, C., & Trischitta, V. (2018). The adiponectin paradox for all-cause and cardiovascular mortality. *Diabetes*, 67(1), 12-22. DOI: 10.2337/dbi17-0016.
- Miao-Lin, H. (1994). Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*, 233, 380-383. DOI: 10.1016/s0076-6879(94)33044-1.
- Michałek, M., Tabiś, A., & Noszczyk-Nowak, A. (2020). Serum total antioxidant capacity and enzymatic defence of dogs with chronic heart failure and atrial fibrillation: a preliminary study. *Journal of Veterinary Research*, 64(3), 439-444. DOI: 10.2478/jvetres-2020-0047.
- Middlekauff, H. R. (1998). The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. *Internal medicine*, 37(2), 112-122. DOI:10.2169/internalmedicine.37.112.
- Mikawa, S., Nagakawa, M., Ogi, H., Akabane, R., Koyama, Y., Sakatani, A., ... & Toda, N. (2020). Use of vertebral left atrial size for staging of dogs with myxomatous valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 30, 92-99. DOI: 10.1016/j.jvc.2020.06.001.
- Martin M. (2015) *Small Animal ECGs: An Introductory Guide*, 3rd Edition, Wiley Blackwell, USA, pp:24-45.
- Millen, A. M., Woodiwiss, A. J., Gomes, M., Michel, F., & Norton, G. R. (2018). Systemic Angiotensinogen Concentrations Are Independently Associated With Left Ventricular Diastolic Function in a Community Sample. *American Journal of Hypertension*, 31(2), 212-219. DOI: 10.1093/ajh/hpx156. PMID: 28985347.
- Mishina, M., Watanabe, T., Fujii, K., Maeda, H., Wakao, Y., & Takahashi, M. (1997). A clinical evaluation of blood pressure through non-invasive measurement using the oscillometric procedure in conscious dogs. *Journal of Veterinary Medical*

- Science*, 59(11), 989-993.. DOI: 10.1292/jvms.59.989.
- Morita, H., Seidman, J., & Seidman, C. E. (2005). Genetic causes of human heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 518-526. DOI: 10.1172/JCI24351.
- Mukherjee, S., Jagadeeshaprasad, M. G., Banerjee, T., Ghosh, S. K., Biswas, M., Dutta, S., ... & Bandyopadhyay, A. (2014). Proteomic analysis of human plasma in chronic rheumatic mitral stenosis reveals proteins involved in the complement and coagulation cascade. *Clinical Proteomics*, 11(1), 35. DOI: 10.1186/1559-0275-11-35
- Murtaugh, M. P. (1994). Porcine cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 43(1-3), 37-44. DOI: 10.1016/0165-2427(94)90118-X.
- Nagai, T., Anzai, T., Kaneko, H., Mano, Y., Anzai, A., Maekawa, Y., ... & Fukuda, K. (2011). C-reactive protein overexpression exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling through enhanced inflammatory response. *Hypertension*, 57(2), 208-215. D: 10.1161/hypertensionaha.110.158915
- Nelson, O. L., Wood, R. M., Häggström, J., Kwart, C., & Robbins, C. T. (2017). Myocardial Adiponectin Isoform Shift in Dogs with Congestive Heart Failure—A Comparison to Hibernating Brown Bears (*Ursus arctos horribilis*). *Veterinary sciences*, 4(3), 35. DOI:10.3390/vetsci4030035.
- Niederbichler, A. D., Hoesel, L. M., Ipaktchi, K., Olivarez, L., Erdmann, M., Vogt, P. M., ... & Hemmila, M. R. (2011). Burn-induced heart failure: lipopolysaccharide binding protein improves burn and endotoxin-induced cardiac contractility deficits. *Journal of Surgical Research*, 165(1), 128-135. DOI: 10.1016/j.jss.2009.06.012. Epub 2009 Dec 6. PMID: 20085844; PMCID: PMC2891338.
- Oberhoffer, M., Karzai, W., Meier-Hellmann, A., Bögel, D., Fabinder, J., & Reinhart, K. (1999). Sensitivity and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in patients with sepsis. *Critical Care Medicine*, 27(9), 1814-1818.
- Oda, S., Hirasawa, H., Shiga, H., Nakanishi, K., Matsuda, K. I., & Nakamura, M. (2005). Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine*, 29(4), 169-175. DOI:10.1016/j.cyto.2004.10.010
- Oikonomou, E., Tousoulis, D., Siasos, G., Zaromitidou, M., Papavassiliou, A. G., & Stefanadis, C. (2011). The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. *Hellenic Journal of Cardiology*, 52(1), 30-40.
- Olivier, E., Soury, E., Ruminy, P., Husson, A., Parmentier, F., Daveau, M., & Salier, J. P. (2000). Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. *Biochemical Journal*, 350(2), 589-597. DOI: 10.1042/bj3500589.
- Olsson, L., Westerberg, B., Persson, H., Fridell, E., Skoglundh, M., & Andersson, B. (1999). A kinetic study of oxygen adsorption/desorption and NO oxidation over Pt/Al₂O₃ catalysts. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(47), 10433-10439.
- Osuga, T., Nakamura, K., Morita, T., Lim, S. Y., Nisa, K., Yokoyama, N., ... & Takiguchi, M. (2015). Vitamin D status in different stages of disease severity in dogs with chronic valvular heart disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(6),

- 1518-1523. DOI: 10.1111/jvim.13606. Epub 2015 Aug 30. PMID: 26332427; PMCID: PMC4895654.
- Ouellet, M., Belanger, M. C., Difruscia, R., & Beauchamp, G. (2009). Effect of pimobendan on echocardiographic values in dogs with asymptomatic mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(2), 258-263. DOI:10.1111/j.1939-1676.2008.0239.x
- Oyama, M. A., & Sisson, D. D. (2004). Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(6), 831-839. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2004.tb02629.x
- Oyama, M. A., Peddle, G. D., Reynolds, C. A., & Singletary, G. E. (2011). Use of the loop diuretic torsemide in three dogs with advanced heart failure. *Journal of Veterinary Cardiology*, 13(4), 287-292. DOI: 10.1016/j.jvc.2011.10.001.
- Packer, M. (1992). The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 20(1), 248-254. DOI:10.1016/0735-1097(92)90167-1
- Pagani, F. D., Baker, L. S., Hsi, C., Knox, M., Fink, M. P., & Visner, M. S. (1992). Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(2), 389-398.
- Paltrinieri, S., Sartorelli, P., De Vecchi, B., & Agnes, F. (1998). Metabolic findings in the erythrocytes of cardiopathic and anaemic dogs. *Journal of comparative pathology*, 118(2), 123-133. DOI: 10.1016/S0021-9975(98)80004-2.
- Pancieria, D. L., & Refsal, K. R. (1994). Thyroid function in dogs with spontaneous and induced congestive heart failure. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 58(3), 157.
- Pankov, A. (2019). Comparative m-mode echocardiographic study of male and female dogs with degenerative mitral valve disease (DMVD). *Tradition and Modernity in Veterinary Medicine*, 4(1), 34-38.
- Parker, H. G., & Kilroy-Glynn, P. (2012). Myxomatous mitral valve disease in dogs: does size matter?. *Journal of Veterinary Cardiology*, 14(1), 19-29. DOI: 10.1016/j.jvc.2012.01.006.
- Parrillo, J. E., Burch, C., Shelhamer, J. H., Parker, M. M., Natanson, C., & Schuette, W. (1985). A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1539-1553.
- Pereira, L., Larsson, M. H. M. A., Neto, M. L., & de Brito, F. S. (2004). Cardiomyopathy of the english cocker spaniel: clinical, electrocardiographic, radiographic and echocardiographic aspect. DOI: 10.1590/S0103-84782004000200013.
- Pereira, Y. M., Woolley, R., Culshaw, G., French, A., & Martin, M. (2008). The vasovagal tonus index as a prognostic indicator in dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of Small Animal Practice*, 49(11), 587-592. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2008.00654.x. PMID: 19006490.

- Petrič, A. D. (2015). Myxomatous mitral valve disease in dogs-An update and perspectives. *Macedonian Veterinary Review*, 38(1), 13-20. DOI: 10.14432/j.macvetrev.2014.11.026.
- Petrič, A. D., Lukman, T., Verk, B., & Svete, A. N. (2018). Systemic inflammation in dogs with advanced-stage heart failure. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60(1), 20. DOI:10.1186/s13028-018-0372-x.
- Polizopoulou, Z. S., Koutinas, C. K., Cerón, J. J., Tvarijonaviciute, A., Martínez-Subiela, S., Dasopoulou, A., ... & O'Brien, P. J. (2015). Correlation of serum cardiac troponin I and acute phase protein concentrations with clinical staging in dogs with degenerative mitral valve disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(3), 397-404. DOI: 10.1111/vcp.12278.
- Porciello, F., Rishniw, M., Herndon, W. E., Biretoni, F., Antognoni, M. T., & Simpson, K. W. (2008). Cardiac troponin I is elevated in dogs and cats with azotaemia renal failure and in dogs with non-cardiac systemic disease. *Australian Veterinary Journal*, 86(10), 390-394. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2008.00345.x
- Pouchelon, J. L., Atkins, C. E., Bussadori, C., Oyama, M. A., Vaden, S. L., Bonagura, J. D., ... & Grauer, G. F. (2015). Cardiovascular–renal axis disorders in the domestic dog and cat: a veterinary consensus statement. *Journal of Small Animal Practice*, 56(9), 537-552. DOI: 10.1111/jsap.12387
- Prihirunkit, K., Sastravaha, A., Lekcharoensuk, C., & Chanloinapha, P. (2014). Hemostatic markers in congestive heart failure dogs with mitral valve disease. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014. DOI: 10.1155/2014/589873.
- Pye, M., Rae, A. P., & Cobbe, S. M. (1990). Study of serum C-reactive protein concentration in cardiac failure. *Heart*, 63(4), 228-230. DOI: 10.1136/hrt.63.4.228.
- Rajappa, M., & Sharma, A. (2005). Biomarkers of cardiac injury: an update. *Angiology*, 56(6), 677-691.. DOI: 10.1177/000331970505600605.
- Rattner, J. B., Mack, G. J., & Fritzler, M. J. (1998). Autoantibodies to components of the mitotic apparatus. *Molecular Biology Reports*, 25(3), 143-155. DOI: 10.1023/A:1016523013819
- Rauchhaus, M., Doehner, W., Francis, D. P., Davos, C., Kemp, M., Liebenthal, C., ... & Anker, S. D. (2000). Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 102(25), 3060-3067. DOI:10.1161/01.cir.102.25.3060.
- Rehman, S. U., Mueller, T., & Januzzi, J. L. (2008). Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(18), 1458-1465. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.07.042.
- Reilly, J. M., Cunnion, R. E., Burch-Whitman, C., Parker, M. M., Shelhamer, J. H., & Parrillo, J. E. (1989). A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac dysfunction and peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock. *Chest*, 95(5), 1072-1080. DOI:10.1378/chest.95.5.1072.
- Reimann, M. J., Häggström, J., Møller, J. E., Lykkesfeldt, J., Falk, T., & Olsen, L. H. (2017). Markers of oxidative stress in dogs with myxomatous mitral valve disease are influenced by sex, neuter status, and serum cholesterol concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(2), 295-302. DOI:10.1111/jvim.14647.

- Reimann, M. J., Ljungvall, I., Hillström, A., Møller, J. E., Hagman, R., Falk, T., ... & Olsen, L. H. (2016). Increased serum C-reactive protein concentrations in dogs with congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. *The Veterinary Journal*, 209, 113-118. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.12.006
- Ribeiro-Samora, G. A., Rabelo, L. A., Ferreira, A. C. C., Favero, M., Guedes, G. S., Pereira, L. S. M., ... & Britto, R. R. (2017). Inflammation and oxidative stress in heart failure: effects of exercise intensity and duration. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(9). DOI: 10.1590/1414-431x20176393.
- Richter, K. R., Nasr, A. N., & Mexas, A. M. (2018). Cytokine concentrations measured by multiplex assays in canine peripheral blood samples. *Veterinary Pathology*, 55(1), 53-67. DOI: 10.1177/0300985817725388.
- Riesen, Kovacevic, Lombard, & Amberger. (2007). Prevalence of heart disease in symptomatic cats: an overview from 1998 to 2005. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 149(2), 65-71.
- Ritter, A. M. V., Faria, A. P. C. D., Sabbatini, A., Corrêa, N. B., Brunelli, V., Modolo, R., & Moreno, H. (2017). MCP-1 levels are associated with cardiac remodeling but not with resistant hypertension. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 108(4), 331-338. DOI: 10.5935/abc.20170033.
- Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Arnao, M. B., & Ceron, J. J. (2016a). Validation of three automated assays for total antioxidant capacity determination in canine serum samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(6), 693-698. DOI:10.1177/1040638716664939.
- Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., & Ceron, J. J. (2016c). Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1-7. DOI:10.1186/s12917-016-0792-7.
- Rubio, C. P., Tvarijonaviciute, A., Martínez-Subiela, S., Hernández-Ruiz, J., & Cerón, J. J. (2016b). Validation of an automated assay for the measurement of cupric reducing antioxidant capacity in serum of dogs. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1-8. DOI:10.1186/s12917-016-0760-2.
- Rychli, K., Kaun, C., Hohensinner, P. J., Dorfner, A. J., Pfaffenberger, S., Niessner, A., ... & Huber, K. (2010). The anti-angiogenic factor PEDF is present in the human heart and is regulated by anoxia in cardiac myocytes and fibroblasts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(1-2), 198-205. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00731.x
- Sarcinella, F., Neves, J., Maddox, T. W., Hodgkiss-Geere, H. M., Bode, E. F., & Dukes-McEwan, J. (2019). Effect of pimobendan on left atrial function in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease. *Open Veterinary Journal*, 9(4), 375-383. DOI: 10.4314/ovj.v9i4.16.
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894), 191-195.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., & Dinarello, C. A. (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses

- IL-1 and TNF. *Blood*, 75(1), 40-47.
- Schober, K. E., Hart, T. M., Stern, J. A., Li, X., Samii, V. F., Zekas, L. J., ... & Bonagura, J. D. (2010). Detection of congestive heart failure in dogs by Doppler echocardiography. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(6), 1358-1368. DOI:10.1111/j.1939-1676.2010.0592.x.
- Schuette, W. H., Burch, C., Roach, P. O., & Parrillo, J. E. (1987). Closed loop television tracking of beating heart cells in vitro. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 8(1), 101-103. DOI:10.1002/cyto.990080115.
- Schultheiss, H. P., Piper, C., Sowade, O., Waagstein, F., Kapp, J. F., Wegscheider, K., ... & Siedentop, H. (2016). Betaferon in chronic viral cardiomyopathy (BICC) trial: Effects of interferon- β treatment in patients with chronic viral cardiomyopathy. *Clinical Research in Cardiology*, 105(9), 763-773. DOI:10.1007/s00392-016-0986-9.
- Sensen CW (2002) Essentials of Genomics and Bioinformatics, Wiley VCH, Calgary, Alberta Canada ISBN: 3-527- 30541- 6
- Seo, J., Matthewman, L., Xia, D., Wilshaw, J., Chang, Y. M., & Connolly, D. J. (2020). The gut microbiome in dogs with congestive heart failure: a pilot study. *Scientific reports*, 10(1), 1-9. DOI: 10.1038/s41598-020-70826-0.
- Serfass, P., Chetboul, V., Sampedrano, C. C., Nicolle, A., Benalloul, T., Laforge, H., ... & Tissier, R. (2006). Retrospective study of 942 small-sized dogs: Prevalence of left apical systolic heart murmur and left-sided heart failure, critical effects of breed and sex. *Journal of Veterinary Cardiology*, 8(1), 11-18. DOI:10.1016/j.jvc.2005.10.001.
- Sergeeva, I. A., & Christoffels, V. M. (2013). Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2403-2413. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.07.003.
- Sharma, R., Coats, A. J., & Anker, S. D. (2000). The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *International journal of cardiology*, 72(2), 175-186. DOI: 10.1016/S0167-5273(99)00186-2.
- Shrader S (2014) Mass Spectrometry, 2nd Edition, CRC Press Taylor & Francis Group, United States, 153-155.
- Sleeper, M. M., Clifford, C. A., & Laster, L. L. (2001). Cardiac troponin I in the normal dog and cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(5), 501-503. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2001.tb01582.x.
- Slimani, H., Zhai, Y., Yousif, N. G., Ao, L., Zeng, Q., Fullerton, D. A., & Meng, X. (2014). Enhanced monocyte chemoattractant protein-1 production in aging mice exaggerates cardiac depression during endotoxemia. *Critical Care*, 18(5), 527. DOI: 10.1186/s13054-014-0527-8
- Smith Jr F, Tilley L, Oyama M et al (2016) Manual of Canine And Feline Cardiology, 5th edition, Saunders press, Missouri, pp: 250-472.
- Soares, E. C., Pereira, G. G., Petrus, L. C., Leomil Neto, M., Yamaki, F. L., & Larsson, M. H. M. A. (2010). Survival and echocardiographic evaluation of dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with carvedilol. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62(3), 555-563. DOI: 10.1590/S0102-09352010000300009.

- Solaro, R. J., Rosevear, P., & Kobayashi, T. (2008). The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(1), 82-87. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.12.114.
- Stabej, P., Leegwater, P. A., Stokhof, A. A., Domanjko-Petrič, A., & van Oost, B. A. (2005). Evaluation of the phospholamban gene in purebred large-breed dogs with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Veterinary Research*, 66(3), 432-436. DOI:10.2460/ajvr.2005.66.432.
- Stanley, B. A., Gundry, R. L., Cotter, R. J., & Van Eyk, J. E. (2004). Heart disease, clinical proteomics and mass spectrometry. *Disease Markers*, 20(3), 167-178.
- Steel, D. M., & Whitehead, A. S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today*, 15(2), 81-88. DOI: 10.1016/0167-5699(94)90138-4.
- Stephan, I., Nolte, I., & Hoppen, H. O. (2003). The effect of hypothyroidism on cardiac function in dogs. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 110(6), 231-239.
- Strohm, L. E., Visser, L. C., Chapel, E. H., Drost, W. T., & Bonagura, J. D. (2018). Two-dimensional, long-axis echocardiographic ratios for assessment of left atrial and ventricular size in dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, 20(5), 330-342. DOI:10.1016/j.jvc.2018.07.008.
- Stuber, F., Petersen, M., Bokelmann, F., & Schade, U. (1996). A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 24(3), 381-384.
- Summerfield, N. J., Boswood, A., O'Grady, M. R., Gordon, S. G., Dukes-McEwan, J., Oyama, M. A., ... & Braz-Ruivo, L. (2012). Efficacy of pimobendan in the prevention of congestive heart failure or sudden death in Doberman Pinschers with preclinical dilated cardiomyopathy (the PROTECT Study). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), 1337-1349. DOI:10.1111/j.1939-1676.2012.01026.x.
- Sun, L., Qi, X., Tan, Q., & Yang, H. (2016). Low Serum-Butyrylcholinesterase Activity as a Prognostic Marker of Mortality Associates with Poor Cardiac Function in Acute Myocardial Infarction. *Clinical Laboratory*, 62(6), 1093-1099. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.151013. PMID: 27468571.
- Szalat, R., Ghillani-Dalbin, P., Jallouli, M., Amoura, Z., Musset, L., Cacoub, P., & Sène, D. (2010). Anti-NuMA1 and anti-NuMA2 (anti-HsEg5) antibodies: Clinical and immunological features: A propos of 40 new cases and review of the literature. *Autoimmunity Reviews*, 9(10), 652-656. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.05.001. Epub 2010 May 10. PMID: 20457279.
- Tanaka, R., & Shimizu, M. (2012). The relationship between reactive oxygen species and cardiac fibrosis in the dahl salt-sensitive rat under ACEI administration. *Veterinary Medicine International*, 2012. DOI: 10.1155/2012/105316
- Tang, W. W., Wu, Y., Mann, S., Pepoy, M., Shrestha, K., Borowski, A. G., & Hazen, S. L. (2011). Diminished antioxidant activity of high-density lipoprotein-associated proteins in systolic heart failure. *Circulation: Heart Failure*, 4(1), 59-64. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.958348

- Tang, Y. D., & Katz, S. D. (2006). Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options. *Circulation*, 113(20), 2454-2461. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583666.
- Tarnow, I., Falk, T., Tidholm, A., Martinussen, T., Jensen, A. L., Olsen, L. H., ... & Kristensen, A. T. (2007). Hemostatic biomarkers in dogs with chronic congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3), 451-457. DOI: 10.1892/0891-6640. PMID: 17552450.
- Tecles, F., Subiela, S. M., Bernal, L. J., & Cerón, J. J. (2000). Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. *The Veterinary Journal*, 160(3), 242-249. DOI:10.1053/tvj.2000.0499.
- Tenenbaum, A., & Fisman, E. Z. (2004). Impaired Glucose Metabolism in Patients with Heart Failure. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 4(5), 269-280.
- Thrusfield, M. V., Aitken, C. G. G., & Darker, P. G. G. (1985). Observations on breed and sex in relation to canine heart valve incompetence. *Journal of Small Animal Practice*, 26(12), 709-717. DOI:10.1111/j.1748-5827.1985.tb02199.x.
- Tizard IR (2013) *Veterinary Immunology*, 9th edition, Elsevier Saunders, Missouri, pp: 11-20.
- Todorova, I., Simeonova, G., Kyuchukova, D., Dinev, D., & Gadjeva, V. (2005). Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comparative Clinical Pathology*, 13(4), 190-194. DOI:10.1007/s00580-005-0547-5.
- Tomasdottir, H., Hjartarson, H., Ricksten, A., Wasslavik, C., Bengtsson, A., & Ricksten, S. E. (2003). Tumor necrosis factor gene polymorphism is associated with enhanced systemic inflammatory response and increased cardiopulmonary morbidity after cardiac surgery. *Anesthesia & Analgesia*, 97(4), 944-949. DOI:10.1213/01.ane.0000078574.76915.11.
- Torre-Amione, G., Kapadia, S., Benedict, C., Oral, H., Young, J. B., & Mann, D. L. (1996). Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Journal of the American College of Cardiology*, 27(5), 1201-1206. DOI: 10.1016/0735-1097%2895%2900589-7.
- Tsutsui, H., Kinugawa, S., & Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. DOI:10.1152/ajpheart.00554.2011.
- Tuttle, R. R., Pollock, G. D., Todd, G., MacDonald, B., Tust, R., & Dusenberry, W. (1977). The effect of dobutamine on cardiac oxygen balance, regional blood flow, and infarction severity after coronary artery narrowing in dogs. *Circulation research*, 41(3), 357-364. DOI:10.1161/01.res.41.3.357.
- Tvarijonavičiute, A., Caldin, M., Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Pastor, J., & Ceron, J. J. (2015). Serum paraoxonase 1 and butyrylcholinesterase in dogs with hyperadrenocorticism. *The Veterinary Journal*, 203(2), 262-263. DOI: 10.1016/j.tvj.2014.12.002
- Tvarijonavičiute, A., Ceron, J. J., & Tecles, F. (2013). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in obese Beagle dogs before and after weight loss. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(2), 207-211. DOI: 10.1111/vcp.12032.

- Tvarijonaviciute, A., Eralp, O., Kocaturk, M., Yilmaz, Z., & Ceron, J. J. (2011). Adiponectin and IGF-1 are negative acute phase proteins in a dog model of acute endotoxaemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140(1-2), 147-151. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.11.011
- Tvarijonaviciute, A., Kocaturk, M., Cansev, M., Tecles, F., Ceron, J. J., & Yilmaz, Z. (2012). Serum butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 in a canine model of endotoxemia: effects of choline administration. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 668-674. DOI:10.1016/j.rvsc.2011.09.010.
- Ueda, S. I., Yamagishi, S. I., Matsui, T., Jinnouchi, Y., & Imaizumi, T. (2011). Administration of pigment epithelium-derived factor inhibits left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction. *The American Journal of Pathology*, 178(2), 591-598. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.10.018
- Uijl, E., Ren, L., & Danser, A. J. (2018). Angiotensin generation in the brain: a re-evaluation. *Clinical Science*, 132(8), 839-850. DOI: 10.1042/CS20180236
- van der Pol, A., van Gilst, W. H., Voors, A. A., & van der Meer, P. (2019). Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *European Journal of Heart Failure*, 21(4), 425-435. DOI: 10.1002/ejhf.1320
- Van Israël, N., French, A. T., Dukes-McEwan, J., & Welsh, E. M. (2003). Patent ductus arteriosus in the older dog. *Journal of Veterinary Cardiology*, 5(1), 13-21. DOI:10.1016/s1760-2734(06)70040-6.
- Vasan, R. S., Sullivan, L. M., Roubenoff, R., Dinarello, C. A., Harris, T., Benjamin, E. J., ... & D'Agostino, R. B. (2003). Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 107(11), 1486-1491. DOI:10.1161/01.cir.0000057810.48709.f6.
- Verk, B., Nemeč Svete, A., Salobir, J., Rezar, V., & Domanjko Petrič, A. (2017). Markers of oxidative stress in dogs with heart failure. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(5), 636-644. DOI:10.1177/1040638717711995.
- Verma, A., Bhatt, P. C., Sethi, N., Rashid, M., Singh, Y., Rahman, M., ... & Kumar, V. (2016). Chemomodulatory effect *Melastoma Malabathricum* Linn against chemically induced renal carcinogenesis rats via attenuation of inflammation, oxidative stress, and early markers of tumor expansion. *Inflammopharmacology*, 24(5), 233-251. DOI: 10.1007/s10787-016-0276-1
- Vinchi, F., De Franceschi, L., Ghigo, A., Townes, T., Cimino, J., Silengo, L., ... & Tolosano, E. (2013). Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation*, 127(12), 1317-1329. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.130179
- Vollmar, A. C. (2000). The prevalence of cardiomyopathy in the Irish wolfhound: a clinical study of 500 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 36(2), 125-132. DOI: 10.5326/15473317-36-2-125.
- Ware, W.A. (2011) *Cardiovascular Disease in Small Animal Medicine*. 3rd edition, Manson Publishing, London, pp: 164-188.
- Weigand, K., & Alpert, E. (1981). Human albumin synthesis via an albumin precursor in

- liver tissue slices. *Experientia*, 37(11), 1145-1147. DOI: 10.1007/BF01989886. PMID: 7318994.
- Wells, S. M., & Sleeper, M. (2008). Cardiac troponins. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(3), 235-245. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2008.00307.x.
- Wess, G., Schulze, A., Butz, V., Simak, J., Killich, M., Keller, L. J. M., ... & Hartmann, K. (2010). Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3), 533-538. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0479.x.
- Willard MD, Tvedten H (2012) Small Animal Clinical Diagnosis By Laboratory Methods, Elsevier, Missouri, pp: 92-111.
- Wu, A. H. (1989). Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease. *Clinical Chemistry*, 35(1), 7-13. DOI: 10.1093/clinchem/35.1.7
- Xu, H., Shang, Q., Chen, H., Du, J., Wen, J., Li, G., ... & Chen, K. (2013). ITIH4: a new potential biomarker of "Toxin Syndrome" in coronary heart disease patient identified with proteomic method. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. DOI: 10.1155/2013/360149
- Xu, Y., Rong, J., & Zhang, Z. (2020). The emerging role of angiotensinogen in cardiovascular diseases. *Journal of Cellular Physiology*. DOI: 10.1002/jcp.29889. Epub 2020 Jun 22. PMID: 32572956.
- Xue, C., Zhang, A., Sun, H., Han, Y., Zou, D., Wang, Y., ... & Wang, X. (2014). An improved ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight high-definition mass spectrometry method for determining ingredients of herbal Fructus corni in blood samples. *Pharmacognosy Magazine*, 10(40), 422. DOI: 10.4103/0973-1296.141796.
- Yanavitski, M., & Givertz, M. M. (2011). Novel biomarkers in acute heart failure. *Current Heart Failure Reports*, 8(3), 206-211. DOI: 10.1007/s11897-011-0065-5.
- Yndestad, A., Damås, J. K., Øie, E., Ueland, T., Gullestad, L., & Aukrust, P. (2006). Systemic inflammation in heart failure—the whys and wherefores. *Heart Failure Reviews*, 11(1), 83-92. DOI: 10.1007/s10741-006-9196-2.
- Yu Vatnikov, A. Rudenko, P. Rudenko, Ev Kulikov, A. Karamyan, V. Lutsay, I. Medvedev, V. Byakhova, E. Krotova and M. Molvhanova *Veterinary World*, 12(9): 1491-1498 DOI: 10.14202/vetworld.2019.1491-1498.
- Zhang, R., Zhang, Y. Y., Huang, X. R., Wu, Y., Chung, A. C., Wu, E. X., ... & Lan, H. Y. (2010). C-reactive protein promotes cardiac fibrosis and inflammation in angiotensin II-induced hypertensive cardiac disease. *Hypertension*, 55(4), 953-960. DOI:10.1161/hypertensionaha.109.140608.
- Zhu, K., Wang, Y., Shu, P., Zhou, Q., Zhu, J., Zhou, W., ... & Tang, L. (2017). Increased serum levels of fetuin B in patients with coronary artery disease. *Endocrine*, 58(1), 97-105. DOI: 10.1007/s12020-017-1387-1
- Zois, N. E., Moesgaard, S. G., Kjelgaard-Hansen, M., Rasmussen, C. E., Falk, T., Fossing, C., ... & Olsen, L. H. (2012). Circulating cytokine concentrations in dogs with different degrees of myxomatous mitral valve disease. *The Veterinary Journal*, 192(1), 106-111. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.05.009.

7. SİMGE ve KISALTMALAR

µL	Mikrolitre
2-DE	İki Boyutlu Elektroforez
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ACTB	Actin Cytoplasmic
ACVIM	Amerikan İç Hastalıkları Koleji
ADH	Antidiüretik Hormon
AFP	Akut Faz Proteinleri
AGT	Angiotensinogen
ALB	Albumin
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin Amino Transferaz
AMY	Amilaz
ANP	Atrial Natriüretik Peptid
Ao	Aort
APPs	Serum Akut Faz Proteinleri
ASL	Argininosuccinate Lyase
AT	Anjiyotensin
ATP	Adenozin Trifosfat
BChE	Butirilkolin Esteraz
BNP	Beyin Natriüretik Peptid
BUN	Kan Üre Nitrojen
BUÜ	Bursa Uludağ Üniversitesi
C3	Komplement
CA	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CHF	Chronic Heart Failure
CKCS	Cavalier King Charles Spaniel
CNP	C tipi Natriüretik Peptid
CPN	Carboxypeptidase
CPN1	Carboxypeptidase N Catalytic Chain İsoform 1
CPN2	Carboxypeptidase N Subunit 2
CRE	Kreatinin

CRP	C-reaktif protein
cTnC	Troponin C
cTnI	Troponin I
cTnT	Troponin T
CUPRAC	Kuprik İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
CVC	Kaudal Vena Cava
CVHD	Kronik Valvüler Hastalık
CW	Continious wave
DAMP	Hasara bağlı Moleküler Yapılar
DAP	Diyastolik Arteriyal Basınç
DCM	Dilate Kardiyomiyopati
DV	Dorsoventral
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EF	Ejection Fraction
EKG	Elektrokardiyografi
EPSS	E-point septal seperation
ET	Endotelin
ET	Ejection Time
FETUB	Fetuin-B
FLC	İmmunoglobulin free like-chain
FRAP	Ferrik İndirgeme Kabiliyeti
FS	Fractional Shortening
GLOB	Globulin
GLU	Glukoz
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HCM	Hipertrofik Kardiyomiyopati
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
Hp	Haptoglobulin
HPX	Hemopexin
IEF	İzoelektrik Odaklanma
IFN	İnterferon
IGLC1	İmmunoglobulin Lambda-1 Light Chain İsoform X38
IL	İnterlöykin
ISACHC	Uluslararası Küçük Hayvan Kalp Sağlığı Konseyi
ITIH2	İnter Alpha Trypsin İnhibitor Heavy Chain H2
ITIH4	İnter Alpha Trypsin İnhibitor Heavy Chain H4
IVS	İnterventriküler Septum
IVSDd	İnterventriküler Septum Diyastol Çapı
IVSDs	İnterventriküler Septum Sistol Çapı
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit
K	Potasyum
KC-like	Keratinosit Kemotaktik benzeri

KKY	Kronik Kalp Yetmezliği
LA	Sol Atriyum
LBP	Lipopolisakkarit bağlayıcı protein
LC	Sıvı Kromatografisi
LC/MS	Likid kromatografi kütle-spektrometresi
L-CHF	Sol Kalp Yetmezliği
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LL	Laterolateral
LPL	Lipoprotein Lipaz
LPS	Lipopolisakkarit
LV	Sol Ventrikül
LVDD	Sol Ventrikül Diyastol İç Çapı
LVDs	Sol Ventrikül Sistol İç Çapı
LVFW	Sol Ventrikül Serbest Duvarı
LVOT	Sol Ventrikül Çıkışı
LVPWDD	Sol Ventrikül Serbest Duvar Diyastol Çapı
LVPWDs	Sol Ventrikül Serbest Duvar Sistol Çapı
MALDI-TOF/MS	Matris Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon Uçuş Kütle Spektrometresi
MAP	Ortalama Arteriyal Basınç
MAPSE	Mitral Annular Plane Systolic Excursion
MCP	Monosit Kemoatraktan Protein
MDA	Malonaldehit
MFI	Median Floresan Yoğunluğu
MMVD	Miksamatöz Mitral Kapak Dejenerasyonu
MPA	Ana Pulmoner Arter
MV	Mitral Kapak
MVP	Mitral Kapak Prolapsusu
Na	Sodyum
NH	Nörohormonal
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
NT-proBNP	N terminal pro Beyin Natriüretik Peptid
NUMA1	Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1
NYHA	New York Kalp Birliği
ORAC	Oksijen Radikal Emme Kapasitesi
PA	Pulmoner Arter
PAGE	Denatüre Edici Olmayan
PAMP	Patojene Bağlı Moleküler Yapılar
PAVmax	Pulmoner Arter Maksimum Velositesi
PEDF	Pigment Epithelium-Derived Factor
PHOS	Fosfor

PON	Paranoksanaz
PPBP	Platelet Basic Protein Precursor
Pre-ApoC-II	Apolipoprotein C2 Precursor
PRR	Patern Tanıma Reseptörleri
PV	Pulmoner Kapak
PW	Pulsed wave
PWDD	Pulsed wave Doku Doppleri
RA	Sağ Atriyum
RAAS	Renin Antijotensin Aldosteron Sistemi
R-CHF	Sağ Kalp Yetmezliği
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
RV	Sağ Ventrikül
RVDd	Sağ Ventrikül Diyastol Çapı
RVET	Sağ Ventriküler Ejeksiyon Zamanları
SAA	Serum Amiloid A
Sağ-KKY	Sağ Kalp Yetmezliği
SAP	Sistolik Arteriyal Basınç
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SELDI-TOF/MS	Yüzey Geliştirilmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Kütle Spektrometresi
SIMD	Sepsis İlişkili Miyokardiyal Disfonksiyon
SIRS	Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
SOD	Süperoksit Dismutaz
Sol-KKY	Sol Kalp Yetmezliği
SSS	Sempatik Sinir Tonu
TAC	Toplam Antioksidan Kapasitesi
TAPSE	Triküspid Annular Plane Systolic Excursion
TBIL	Total Biluribin
TDI	Doku Doppleri
TEAC	Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TN	Tetranektin
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TP	Total Protein
TTR	Transthyretin
TV	Triküspid Kapak
UPLC	Ultra Performans Likit Kromatografi
VD	Ventrodorsal
VHS	Vertebral Kalp Skoru
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
VREB1	İmmunoglobulin iota chain like
WBC	Total Lökosit
XO	Ksantin Oksidaz

8. EKLER

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: Kronik kalp yetmezliğinin (chronic heart failure; CHF) öncelikli patofizyolojik mekanizmaları, bunları tetikleyen hastalıklar (etiyoloji) ve oluşturdukları kalp yetmezliği tipi (L-CHF; sol kalp yetmezliği ve R-CHF; sağ kalp yetmezliği)

Tablo-2: Nöyrohumoral mekanizmada aktive olan sistemler; kompenzatuvar mekanizmaların kısa süreli olumlu ve uzun sürede ortaya çıkan olumsuz etkileri

Tablo 3: Farklı kuruluşlara göre kalp yetmezliklerinin sınıflandırılması ve karşılaştırılması

Tablo 4: Kalp yetmezliğinin yerleşim yerine göre klinik belirti ve olası nedenleri

Tablo 5: ACVIM klasifikasyonuna göre teşhis ve tedavi seçenekleri

Tablo 6: Grupların ACVIM derecelendirme sistemine göre dağılımı ve klinik, radyolojik ve ekokardiyografik (LA/Ao ve LVIDDN) bulgulara göre tanısal kriterleri

Tablo 7: Radyolojik bulguların varlığı ve şiddetine göre skorlandırılarak konjestif kalp yetmezliğinin belirlenmesi

Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen köpeklerin ırk dağılımları ve ACVIM sınıfları

Tablo 9: Kontrol ve test grubu köpeklerde klinik parametrelerin ortalama ve minimum-maksimum değerleri

Tablo 10: C sınıfı köpeklerde klinik parametrelerin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri (minimum-maksimum)

Tablo 11: Kontrol ve test grubu köpeklerde ekokardiyografik ölçümlerin ortalama değerleri ve standart hataları (sağ parasternal uzun eksen 4 boşluk M-mode ölçümleri)

Tablo 12: Kontrol ve test grubu köpeklerde ekokardiyografik ölçümlerin ortalama değerleri ve standart hataları (sağ parasternal kısa eksen aort düzeyi ölçümleri)

Tablo 13: Kontrol ve test grubu köpeklerde ekokardiyografik ölçümlerin ortalama değerleri ve standart hataları

Tablo 14: Kontrol ve test grubu köpeklerde rutin hemogram parametrelerinin ortalama ve minimum-maksimum değerleri (minimum-maksimum)

Tablo 15: C sınıfı köpeklerde rutin hemogram parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri (minimum-maksimum)

Tablo 16: Kontrol ve test grubu köpeklerde serum biyokimyasal parametrelerinin ortalama ve minimum-maksimum değerleri

Tablo 17: C sınıfı köpeklerde serum biyokimyasal parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri (minimum-maksimum)

Tablo 18: Kontrol ve test grubu köpeklerde vitamin D ve D-Dimer parametrelerinin ortalama ve minimum-maksimum değerleri

Tablo19: C sınıfı köpeklerde serum biyokimyasal parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimleri (minimum-maksimum)

Tablo 20: Yangısal parametreler ile kardiyolojik parametreler arasındaki korelasyonlar

Tablo 21: Kontrol grubuna göre kalp yetmezlikli köpeklerde tespit edilen tüm proteinlerin (istatistiksel olarak anlamlı ve anlamsız) isim, peptid sayıları ve tanımlamaları

Tablo 22: Kontrol ve B sınıfı hasta grubunda ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren serum proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları

Tablo 23: Kontrol ve C sınıfı hasta grubunda ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren serum proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları

Tablo 24: Kontrol ve D sınıfı hasta grubunda ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren serum proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları

Tablo 25: Kontrol ve tedavi sonrası hasta grubunda ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren serum proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: Kalp ve kalp ile bağlantısı olan damarların anatomisi, kalp içinde kanın akış yönleri (A) ve kalp odacıkları arasındaki basınç farklılıkları (gradyan) (B).

Şekil-2: Mitral regürjitasyona bağlı sekonder pulmoner hipertansiyon şekillenme mekanizması

Şekil-3: KKY gelişiminde rol oynayan kompenzatuvar mekanizmalar

Şekil-4: Kalp yetmezliği gelişiminde sitokin (inflamatuvar yanıt) ve oksitadif stresin etkileri

Şekil 5: Genomik, transkriptomik ve proteomik arasındaki bağlantı

Şekil 6: Elektrokardiyografi uygulaması ve elektrotların bağlanması

Şekil 7: Ekokardiyografi muayenesinin uygulanması

Şekil 8: Sağ parasternal kısa eksen aort düzeyinde yapılan sol atriyal ve aort çap ölçümü (Sol), sağ parasternal kısa eksen aort düzeyinde yapılan pulmoner arter çap ölçümü (Sağ), sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyinde yapılan sol ventrikül M-mode ölçümü

Şekil 9: Sağ parasternal uzun eksen 4 boşluk görüntüsü

Şekil 10: Kapak ve damar akım karakteristikleri; apikal 4-5 boşluk görünümünde mitral (A), triküspid (B), aort (C) ile sağ parasternal kısa eksen görünümünde pulmoner arter velosite ölçümleri (D)

Şekil 11: B2 sınıfı kalp yetmezliği olgusunda pulmoner arterin renkli Doppler muayenesi

Şekil 12: Apikal görüntü, mitral kapağın renkli akım ile muayenesi

Şekil 13: Renkli akımın takip edilmesiyle CW Doppler modu ile mitral regürjitasyon velositesinin belirlenmesi

Şekil 14: Non-invazif Doppler tansiyon ölçümü uygulaması

Şekil 15: Proteomik analiz (LC/MS) algoritması

Şekil 16: C sınıfı hastanın laterolateral radyografisi (Shihtzu, 1,5 yaş, dişi, 4kg)

- Şekil 17:** C sınıfı hastanın ventrodorsal radyografisi (Shihtzu, 1,5 yaş, dişi, 4kg)
- Şekil 18:** D sınıfı hastanın EKG görüntüsü (5mm/mV-50 mm/s): atriyal fibrilasyon ve ventriküler ekstra sistol (Kangal, 6 yaş, erkek, 50 kg)
- Şekil 19:** C sınıfı hastada mitral regürjitasyon örneği (Cavalier King Charles, 5 yaş, dişi, 11,5 kg)
- Şekil 20:** C sınıfı hastada dilate kardiyomiyopati (Kangal, 1,5 yaş, erkek, 45 kg)
- Şekil 21:** Apikal 4 boşluk pozisyonunda mitral regürjitasyon (Pekingese, 14yaş, dişi, 6kg)
- Şekil 22:** Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum KC-like düzeylerindeki değişimler. (Mavi-MMVD, Kırmızı-DCM'li olguları göstermektedir.)
- Şekil 23:** Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum sitokin değişimleri (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IP-10)(Mavi- MMVD, Kırmızı-DCM'li olguları göstermektedir.)
- Şekil 24:** Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum sitokin değişimleri (IL-7, IL-15, MCP-1, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α)(Mavi- MMVD, Kırmızı-DCM'li olguları göstermektedir.)
- Şekil 25:** Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum akut faz proteinlerinin değişimleri (Mavi-MMVD, Kırmızı-DCM'li olguları göstermektedir.)
- Şekil 26:** Sağlıklı kontrol (A) ile karşılaştırıldığında ACVIM'e göre farklı şiddetteki kalp yetmezliği olgularında serum oksidatif stres parametreleri (Mavi - MMVD, Kırmızı - DCM'li olguları göstermektedir)
- Şekil 27:** C sınıfı hastalarda akut faz parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimi
- Şekil 28:** C sınıfı hastalarda oksidatif stres parametrelerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimi
- Şekil 29:** Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının moleküler fonksiyonları
- Şekil 30:** Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının biyolojik fonksiyonları
- Şekil 31:** Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının selüler yapılarıdaki dağılımları
- Şekil 32:** Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının yolak analizi
- Şekil 33:** Kontrol grubuna göre hasta gruplarında değişim gösteren serum proteomlarının protein sınıfları
- Şekil 34:** Bu çalışmada kontrol grubuna göre B grubunda izole edilen istatistiksel düzeyde anlamlı serum proteomlarının accession numaraları, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına göre dağılımları
- Şekil 35:** Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda serum angiotensinogen düzeyindeki değişim
- Şekil 36:** Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda lipopolysaccharide binding protein düzeyindeki değişim

Şekil 37: Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda immunoglobulin iota chain-like düzeyindeki değişim

Şekil 38: Kontrol grubuna göre B2 sınıfı hastalarda carboxypeptidase N subunit 2 düzeyindeki değişim

Şekil 39: Bu çalışmada kontrol grubuna göre C grubunda izole edilen istatistiksel düzeyde anlamlı serum proteomlarının accession numaraları, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına göre dağılımlar

Şekil 40: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda argininosuccinate lysase düzeyindeki değişim

Şekil 41: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1 düzeyindeki değişim

Şekil 42: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement C3 düzeyindeki değişim

Şekil 43: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement C4-A düzeyindeki değişim

Şekil 44: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda ITIH2 düzeyindeki değişim

Şekil 45: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda ITIH4 isoform X1 düzeyindeki değişim

Şekil 46: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda ITIH4 isoform X3 düzeyindeki değişim

Şekil 47: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda NUMA1 düzeyindeki değişim

Şekil 48: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda actin cytoplasmic 1 düzeyindeki değişim

Şekil 49: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda apolipoprotein C-II precursor düzeyindeki değişim

Şekil 50: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement component C7 düzeyindeki değişim

Şekil 51: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement component C8 alpha chain düzeyindeki değişim

Şekil 52: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement factor I düzeyindeki değişim

Şekil 53: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda complement factor D düzeyindeki değişim

Şekil 54: Kontrol grubuna göre C sınıfı hastalarda hemopexin düzeyindeki değişim

Şekil 55: Bu çalışmada kontrol grubuna göre D grubunda izole edilen istatistiksel düzeyde anlamlı serum proteomlarının accession numaraları, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına göre dağılımlar

Şekil 56: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda lipopolisaccaride binding protein düzeyindeki değişim

Şekil 57: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda NUMA1 düzeyindeki değişim

Şekil 58: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda actin cytoplasmic 1 düzeyindeki değişim

Şekil 59: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda adiponektin düzeyindeki değişim

Şekil 60: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda angiotensinogen düzeyindeki değişim

Şekil 61: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda fetuin-B düzeyindeki değişim

Şekil 62: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda immunoglobulin lambda-1 light chain düzeyindeki değişim

Şekil 63: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda platelet basic protein precursor düzeyindeki değişim

Şekil 64: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda serum albumin isoform düzeyindeki değişim

Şekil 65: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda serum albumin precursor düzeyindeki değişim

Şekil 66: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda serum paranoxonase/arylesterase 1 düzeyindeki değişim

Şekil 67: Kontrol grubuna göre D sınıfı hastalarda tetranectin düzeyindeki değişim

Şekil 68: Bu çalışmada kontrol grubuna göre tedavi sonrası grubunda izole edilen istatistiksel düzeyde anlamlı serum proteomlarının accession numaraları, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına göre dağılımlar

Şekil 69: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda carboxypeptidase N catalytic chain isoform düzeyindeki değişim

Şekil 70: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda complement C3 düzeyindeki değişim

Şekil 71: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda actin cytoplasmic 1 düzeyindeki değişim

Şekil 72: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda angiotensinogen düzeyindeki değişim

Şekil 73: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda complement factor H düzeyindeki değişim

Şekil 74: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda fetuin-B düzeyindeki değişim

Şekil 75: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda immunoglobulin lambda-1 light chain düzeyindeki değişim

Şekil 76: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda serum albumin isoform düzeyindeki değişim

Şekil 77: Kontrol grubuna göre tedavi sonrası gruptaki hastalarda serum albumin precursor düzeyindeki değişim

Şekil 78: Bu çalışmada canis lupus familiaris protein veri bankasına göre tanımlanan tüm proteinler ve bu proteinlerin birbiri ile olan ilişkisi. Komplement sistemin kendi arasında (C1, C2 ve C4), fetuin (FETUB), serpin ve hemopeksinin (HPX) diğer proteinlerle olan ilişkisi dikkat çekicidir (www.string-db ile oluşturulmuştur).

9. TEŞEKKÜR

Doktoraya başladığım ilk günden beri her zaman yanımda olan sadece bilimsel olarak değil maddi manevi beni destekleyen değerli hocam, abim, en iyi arkadaşım Prof. Dr. Zeki YILMAZ'a, tez çalışmasının yapılabilmesi için maddi destek sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (OUAP(V)-2018/12), tezin laboratuvar analizleri için bilgi ve hizmet alımı sağladığımız Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL ve asistanı Emel AKGÜN'e (Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, İstanbul), kardiyoloji alanında gelişmeye ve tez çalışmamın ekokardiyografik görüntülerini edinmemde verdiği desteklerden dolayı Prof. Dr. Ryou Tanaka Shimizu'ya, kardiyoloji hastası bakmaya başladığım ilk günlerde bana çok yardım eden Doç. Dr. Carlos Fernando Agudelo Ramirez'e, sitokin analizleri için hizmet alımı sağladığımız çalışma arkadaşlarımız Prof. Dr. Jose Ceron ve Camilla Perez Rubio'ya, doktora eğitimim süresince mesleki becerilerimi geliştirmeme yardımcı olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Meriç KOCATÜRK'e, tez çalışmam süresince ve sonrasında her zaman yanımda olan arkadaşım Veteriner Hekim Dr. Pınar LEVENT'e, okumayı öğrendiğim ilk günden doktor olduğum güne kadar maddi manevi her şekilde beni destekleyen, güvenlerinden bir kere bile şüphe duymadığım babam Ali SARIL, annem Ezel SARIL ve kardeşim Ayberk SARIL'a, desteğini kelimelere sığdıramadığım hayatın her anında yanımda olan, olmasaydı olmazdı dediğim eşim Veteriner Hekim Dr. Canan ALTINCI SARIL'a teşekkürü bir borç bilirim.

10. ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Bergama'da doğmuştur. İlk ve orta okulu Bergama Zübeyde Hanım İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimi 2009 yılında Bergama Akif Ersezgin Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. 2009 yılında yerleştiği Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2015 yılında mezun olmuş, 2016 güz yarıyılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne kaydını yaparak Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda doktora programına başlamıştır.

Doktora eğitimi sürecinde ulusal ve uluslararası kongrelere katılımcı olmuş, bazılarında poster sunumu yapmıştır. Küçük hayvan kardiyolojisi öncelikli ilgi alanıdır.

