

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DÜŞÜK EJEKSİYON FRAKSİYONLU KALP YETMEZLİĞİ
HASTALARININ KANLARINDA BNP İLE PROADRENOMEDÜLLİN,
KOPEPTİN VE OKSİDATİF STRES ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ömer YAVUZ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Erdinç DEVRİM

ANKARA

2018

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DÜŞÜK EJEKSİYON FRAKSİYONLU KALP YETMEZLİĞİ
HASTALARININ KANLARINDA BNP İLE PROADRENOMEDÜLLİN,
KOPEPTİN VE OKSİDATİF STRES ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ömer YAVUZ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Erdinç DEVRİM

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 17L0230001 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2018

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

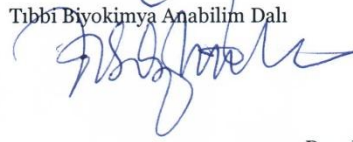
I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Ömer YAVUZ	Sınav tarihi: 15 / 01 / 2018
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Biyokimya AD	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Erdinç DEVRİM	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Düşük Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği Hastalarının Kanlarında BNP ile Poadrenomedüllin, Kopeptin ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişkinin Araştırılması.	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

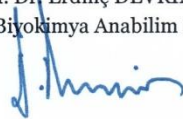
III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Jüri Başkanı
Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Erdinç DEVRİM
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Jüri Üyesi
Doç. Dr. Özlem GÜLBAHAR
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya AD



ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimi aldığım süre boyunca, tez çalışmalarım ve akademik çalışmalarım sırasında, ayrıca eğitimimde karşılaştığım her türlü zorluk karşısında, rehberliğini, bilgi birikimini ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. Erdinç Devrim başta olmak üzere, eğitimim boyunca her zaman tecrübe ve bilgilerine başvurduğum değerli hocalarım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hasan Serdar Öztürk'e, Sayın Prof. Dr. İlker Durak'a, Sayın Prof. Dr. Serenay Elgün Ülkar'a, Sayın Prof. Dr. Aslıhan Avcı'ya ve Sayın Prof. Dr. Berrin İmge Ergüder'e;

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca en büyük desteğim değerli eşim Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı Doktor Burcu Çapraz Yavuz'a ve canım oğlum yaşam kaynağım Ahmet Emir Yavuz'a;

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Süleyman Büber'e, Dr. Özkan Özer'e, Dr. Pınar Koyuncu'ya, Dr. Metin Genç'e, Dr. Hikmet Can Çubukçu'ya, Dr. Mustafa Durmaz'a;

Anabilim Dalımızın değerli çalışanları Ömer Savran, Sema Öztürk, Nurhan Gödelekoğlu, Nurdan Torunoğlu, Kadime Kızılırmak ve Hidayet Arslan'a;

Sayın Uz. Dr. Esra Elmalı'ya, Sayın Uz. Dr. Zihni Karaeren'e, Uz. Dr. Özlem Doğan'a Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve Cebeci Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nın değerli çalışanlarına;

Tez çalışmamın yürütülmesinde bilgi, emek ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Çağdaş Özdöl'e ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Kalp Merkezi Kardiyoloji Servisinde görevli asistan doktor ve çalışanlarına;

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Ömer YAVUZ

Ankara, 2018

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kalp Yetmezliği	4
2.1.1. Kalp Yetmezliği Tanımı	4
2.1.2. Kalp Yetmezliği Epidemiyolojisi	4
2.1.3 Kalp yetmezliği risk faktörleri ve nedenleri	5
2.1.4. Kalp Yetmezliği Evrelendirilmesi	7
2.1.5 Kalp Yetmezliğinde Tanı	7
2.1.6 Kalp Yetmezliğinde Tedavi ve İzlem	9
2.1.7 Kalp Yetmezliğinde Prognoz	10
2.2 Natriüretik Peptitler	11
2.2.1 B-tip Natriüretik Peptit	11
2.3 Adrenomedüllin	14
2.4 Kopeptin	17
2.5 Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve Oksidatif Stres	20
2.5.1 Reaktif Oksijen Türleri	21
2.5.2 ROT Üretim Yolakları	24
2.5.3 Oksidatif Stres	25
2.6 Kardiyovasküler Hastalıklar, Kalp Yetmezliği ve Oksidatif Stres	27

2.7 Kalp Yetmezliği Biyobelirteçleri, Oksidatif ve Antioksidan Sistem Belirteçlerinin KY'deki Yeri	32
2.7.1 Malondialdehit (MDA)	38
2.7.2 Ksantin Oksidaz	39
2.7.3 Süperoksit Dismutaz (SOD)	39
2.7.4 Katalaz (KAT)	40
2.7.5 Glutasyon peroksidaz (GSH-PO)	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1 Gönüllü Seçimi ve Hastaların Gruplandırılması	42
3.2 Hasta Numunelerinin Alınması, Saklanması ve Analiz Numunelerinin Oluşturulması	42
3.3 Deneylerde Kullanılan Gereçler	43
3.4 Tam Kan, Plazma, Eritrosit ve Serumda Ölçümü Yapılan Parametrelere Ait Yöntemler	43
3.4.1 BNP Düzeyi Ölçüm Yöntemi	43
3.4.2 Proadrenomedüllin Düzeyi Ölçüm Yöntemi	43
3.4.3 Kopeptin Düzeyi Ölçüm Yöntemi	45
3.4.4 MDA Miktarı Ölçüm Yöntemi	46
3.4.5 SOD Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	48
3.4.6 Katalaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	50
3.4.7 Ksantin Oksidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	50
3.4.8 Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	52
3.4.9 Kreatinin ve GFH ölçümü	53
3.5 İstatistiksel Değerlendirme	54
4. BULGULAR	55

5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	67
ÖZET	68
SUMMARY	69
KAYNAKLAR	70
EKLER	94
EK 1. Etik Kurul Onayı	96
EK 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	98



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Δ OD: Delta optik dansite

μ M: Mikromolar

μ l: mikrolitre

μ mol: Mikromol

5-MTHF: 5-metil tetrahidro folat

8-OHdG: 8-hidroksi- 2'-deoksiguanozin

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ADH: Antidiüretik hormon

ADM: Adrenomedüllin

AHA: Amerikan Kalp Birliği

AMBP-1: Adrenomedüllin bağlayan protein-1

AMI: Akut miyokard İnfarktüsü

Ang: Anjiotensin

ANP: Atrial natriüretik peptid

APO-E: Apolipoprotein E

AVP: Arjinin-vazopressin

BACH: 'Biomarkers in Acute Heart Failure'

BH4: Tetrahidrobiyopterin

BIC-8: "Biomarkers In Cardiology-8"

BNP: Beyin natriüretik peptid

Ca: Kalsiyum

cAMP: Siklik Adenin Mononükleotit Fosfat

cDNA: Komplementer DNA

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

CGRP: Kalsitonin gen ilişkili peptid

CKD-EPI: “Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration”

CMIA: Kemiluminesan mikropartikül immunolojik analiz yöntemi

CNP: C-tipi natriüretik peptid

$\text{CO}_2^{\cdot -}$: Karbondioksit radikali

$\text{CO}_3^{\cdot -}$: Karbonat radikali

CPK: Kreatin kinaz

CPP: Kopeptin

CRLR: Kalsitonin reseptör benzeri reseptör

CRP: C reaktif protein

Cu-Zn SOD: Bakır-çinko süperoksit dismutaz

CuCl_2 : Bakır klorür

CV: Varyasyon katsayısı

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Deoksiribonükleik asit

e^- : Elektron

EC-SOD: Hücre dışı yerleşimli süperoksit dismutaz

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EF: Ejeksiyon fraksiyonu

EKG: Elektrokardiyografi

EKO: Ekokardiyografi

ELISA: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

ESC: Avrupa Kardiyoloji Derneği

FADH₂: İndirgenmiş flavin adenin dinükleotid

Fe: Demir

Fe-SOD: Demir süperoksit dismutaz

GFH: Glomerüler filtrasyon hızı

GSH-PO: Glutasyon peroksidaz

g: Gram

GSH: İndirgenmiş glutasyon

GS-SG: Yükseltgenmiş glutasyon

H: Hidrojen

H[•]: Hidrojen radikali

H₂O: Su

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HAPPY : ‘Heart failure prevalence and predictors in Turkey’

HCl: Hidroklorik asit

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HETEs: Hidroksieikozatetraenoik asit

HNE: 4-hidroksinonenal

HO₂[•]: Hidroperoksil radikali

HOBr: Hipobromik asit

HOCl: Hipokloröz asit

HOOCO₂⁻: Peroksomonokarbonat,

HPETEs: Hidroperoksieikozatetraenoik asit

HPLC: Yüksek basınçlı likit kromatografi

HRP: “Horse Radish” Peroksidaz

IL: İnterlökin

IU: İnternasyonal Ünite

iNOS: İndüklenabilir nitrik oksit sentaz

K⁺¹: Potasyum

KAT: Katalaz

kDa: Kilodalton

KH₂PO₄: Mono potasyum fosfat

KKH: Koroner Kalp Hastalığı

KKY: Konjestif Kalp Yetmezliği

KO: Ksantin oksidaz

KO: Ksantin oksidaz

KoQ: Koenzim Q

KVH: Kardiyovasküler Hastalık

KY: Kalp yetmezliği

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

L: Litre

LOO•: Lipit peroksil radikali

LOOH: Lipit hidroperoksit

M: Molarite (mol/L)

MAO: Monoamin oksidaz

MAPK: Mitojen aktive eden kinaz

MDA: Malondialdehit

Mid Regional-ProADM: Orta bölge proadrenomedüllin

mg: Miligram

ml: Mililitre

Mn-SOD: Manganez süperoksit dismutaz

MPO: Miyeleperoksidaz

mRNA: Mesajcı RNA

Na₂CO₃: Sodyum karbonat

Na₂HPO₄: Disodyum fosfat

NaCl: Sodyum klorür

NADP⁺: Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NaOH: Sodyum Hidroksit

NBT: Nitroblue tetrazolium

ng: Nanogram

nm: Nanometre

nmol/ml: Nanomol/mililitre

nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz

NO: Nitrik oksit

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

NPR: Natriüretik peptit reseptörleri

NT-pro-BNP: N terminal pro-BNP

NYHA: New York Kalp Birliği

O₂^{•-}: Süperoksit radikali

O₂¹ Σg⁺: Singlet oksijen radikali

O₂¹ Δg: Singlet oksijen

O₂NOO⁻: Peroksinitrat

O₂NOOH: Peroksinitrik asit

OD: Optik dansite

OH[·] : Hidroksil radikali

ONOO⁻ : Peroksinitrit

ONOO⁻CO₂⁻ : Nitrozoperoksikarbonat

ONOOH : Peroksinitröz asit

PAMP: Proadrenomedüllin amino terminal 20 peptid

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

pg: Pikogram

PPV: Pozitif prediktif değer

ProADM: Proadrenomedüllin

RAMP: Reseptör aktivite düzenleyici protein

RCF: Göreceli santrifüj gücü

REF-HF: “Reduced Ejection Fraction-Heart Failure”

RLU: Reaksiyon bağıl ışık birimleri

RO[·] : Alkoksil radikali

RO₂[·] : Peroksil radikali

ROC: “Receiver Operating Characteristic” eğri analizi

ROOH: Organik peroksitler

ROT: Reaktif oksijen türleri

r_s: Spearman testine göre korelasyon katsayısı

SOD : Süperoksit dismutaz

TBA: Tiyobarbitürik asit

TBARS: TBA ile tepkimeye giren maddeler

TCA: Trikloroasetik asit

TEP: Tetraetoksipropan

TGF-β1: Değişiklik yapan büyüme etkeni beta-1

TNF- α :Tümör nekroz faktör alfa

TNF- β : Tümör nekroz faktör beta

Trx: Tioeredoksin

v/v: Hacim/hacim

w/v: Ağırlık/hacim



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Akut başlangıçlı olmayan kalp yetmezliği tanı algoritması	9
Şekil 2.2: Kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi olan bazı ROT'lar ve üretim mekanizmaları	24
Şekil 3.1: Proadrenomedüllin standart grafiği	44
Şekil 3.2: Kopeptin standart grafiği	46



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: ESC (Avrupa Kardiyoloji derneği) 2016 kılavuzuna göre KY nedenleri	6
Tablo 2.2: ESC (Avrupa Kardiyoloji derneği) 2016 kılavuzuna göre KY belirti ve bulguları	8
Tablo 2.3: Serbest radikaller ve radikal olmayanlar	22
Tablo 3.1: MDA ölçümünde kullanılan deney protokolü	47
Tablo 3.2: SOD aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol	49
Tablo 3.3: KO aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol	51
Tablo 3.4: Glutatyon peroksidaz aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol	52
Tablo 4.1: Çalışmaya katılan hastalarda ölçülen parametrelerin incelenmesi	55
Tablo 4.2: Cinsiyetlere göre hasta verilerinin dağılımı	56
Tablo 4.3: BNP konsantrasyonu ile proadrenomedüllin ve kopeptin düzeylerinin korelasyonlarının incelenmesi	57
Tablo 4.4: BNP konsantrasyonu ile oksidatif stres ve antioksidan savunma belirteçlerinin korelasyonlarının incelenmesi	58

1. GİRİŞ

Kalp yetmezliği (KY), kardiyovasküler hastalıklar içerisinde yer alan birçok belirti ve bulguya sahip yaşamı tehdit eden bir sağlık sorunudur. Ülkemizde yapılan HAPPY çalışmasına göre 2 milyonun üzerinde birey KY ile yaşamaktadır (1). Amerikan Kalp Birliği (American Heart Association) 2012'den 2030 yılına kadar KY'de yaklaşık % 46'lık bir artış beklendiğini; 2030 yılında ABD'de 18 ve üzeri yaş grubunda 8 milyondan fazla bireyde (2011 yılında 5,8 milyon bireyde mevcut) KY görüleceğini öngörmüştür (2, 3). Kalp yetmezliğine bağlı hastalık yükünün ve ölümün engellenmesinin öncelikli bir sağlık çözümü haline gelmesi beklenmektedir.

Kalp yetmezliğinin ne olduğu konusunda farklı tanımlamalar yapılmıştır. Bunların ilki Thomas Lewis tarafından “Kalbin muhteviyatının yeterince boşalamaması durumudur” olarak dile getirilirken Paul Wood, “Kalbin vücudun ihtiyacı için gereken yeterli dolaşımı sağlayamaması durumudur” demiştir (4). İlk değerlendirmelerde KY sol ventrikül pompalama yeteneğinin bozulması olarak vurgulansa da günümüzde ventrikülün doluş ve pompalama yeteneğini etkileyen yapısal ve işlevsel değişikliklerin neden olduğu semptom ve fiziki bulguların birleşimi olan bir sendrom olarak görülmektedir (5).

Ne yazık ki KY tanısı için tek bir test bulunmamaktadır. Mevcut testlerin de tanısal doğruluğu klinik bulgulara göre genellikle yetersiz bulunmuştur (6). Natriüretik peptidlerin güvenilir tanı ve prognostik araçlar olduğu gösterilmesine rağmen, bu belirteçlerin kronik kalp yetmezliği için medikal tedavinin yönetiminde yardımcı olarak kullanılabileceği belirsizliği korunmuştur (7). KY'nin değerlendirilmesinde son dönemlerde yeni biyobelirteçlere artan bir ilgi olmuştur ve çok sayıda laboratuvar testinin kullanılması noktasında öneriler bulunmaktadır (8). Kalp yetmezliği olan hastalar için klinik uygulama kılavuzlarının ve hastalık yönetimi stratejilerinin ortaya çıkması hastaların takibinde belirgin genel iyileştirmelere neden olsa da, kalp yetmezliği olan hastaların bu süreçteki yönetimi zorlayıcı olmaya devam etmektedir. Kalp yetmezliği olan hastaların tedavisinin yönetiminde yararlı olacağı düşünülen biyokimyasal bir belirtecin en az 2 şartı yerine getirmesi gerekir; ilki KY için yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte olmalı farklı klinik laboratuvarlardaki ölçümleri standardize edilmiş olmalıdır (8). Ayrıca, biyobelirtecin seviyesindeki küçük değişiklikler hastanın klinik durumundaki gerçek değişimleri yansıtacak şekilde olmalı ve ölçümünden kaynaklanan hata (varyasyon katsayısı), biyobelirtecin tüm değerleri boyunca yeteri kadar düşük olmalıdır (8). Son olarak, biyobelirtecin ölçümü kolay olmalı ve hastanın tedavi sırasında sonuçlar hızlıca

elde edilmelidir (8). İkinci olarak biyobelirteç hastanın klinik durumundaki ve prognozundaki değişimleri iyi yansıtmalıdır (8). Hastanın tedavisi değiştiğinde ortaya çıkan klinik değişimlerle biyobelirteç seviyelerindeki değişimlerin uyumlu olması gerekmektedir. Ayrıca ideal biyobelirtecin bireylerin yaş, cinsiyet ve ırk gibi biyolojik farklılıklarına optimize edilmesi önerilmiştir (8).

Literatürde incelenen sayısız biyobelirteçten natriüretik peptidler tanımlananlar içerisinde en faydalı biyobelirteçlerden olmuştur. Özellikle ANP (atrial natriüretik peptid) ve BNP (beyin natriüretik peptid) seviyelerinin KY'li hastaların seyrinde arttığı görülmüştür. BNP seviyelerinin ANP'ye göre daha güvenilir olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalara göre ANP'nin mortalite hızını öngörme ve hastaneye yatış gereksinimi noktasında BNP'den daha az duyarlı olduğu belirtilmiştir (9, 10). Kalp yetmezliği tedavisinin etkinliğini değerlendirmek için kullanılan BNP'nin pek çok potansiyel gücüne rağmen, yapılan bir çalışmada BNP seviyelerinin tedavi süresince arttığı izlenmiştir (11). İdeal biyolojik belirleyicinin özellikleriyle ilgili olarak ortaya konulanlar sonucunda, kalp yetmezliği olan hastalar için klinik bakımın optimize edilmesi için biyolojik belirteçleri güvenilir şekilde kullanmak noktasında gereken seviyeye ulaşamadığımız açıktır. Akut dekompanse KY'deki biyolojik göstergeler arasında, diğer tüm belirteçler için bir karşılaştırma görevi gören altın standart biyolojik belirteçi temsil eden, en iyi incelenen ve doğrulanan natriüretik peptidler olmuştur (12). Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında özellikle düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarında natriüretik peptidlerin diğer biyobelirteçler ile karşılaştırıldığında altın standart olduğu belirtilmiştir (13-15).

Kalp yetmezliği hastalarında natriüretik peptidlerin yanısıra farklı biyobelirteçlerin klinik kullanımına yönelik farklı çalışmalar bulunmaktadır. Üzerinde çalışılan veya çalışılmaya devam bu biyobelirteçlerin içinde proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidatif stres belirteçleri yer almaktadır. Proadrenomedüllin birçok dokudan sentezlenen ve salınan adrenomedüllin peptidinin prekürsörüdür (16). KY'li hastalarda proadrenomedüllin düzeylerinin artışı sistolik fonksiyonun kötüleşmesi ile korele bulunmuştur (17). Çok uluslu BACH (Biomarkers in Acute Heart Failure) çalışmasında akut dispne ile acil kliniğine başvuran kalp yetmezliği hastalarında midregional proadrenomedüllin düzeylerinin yüksek prognostik değere sahip olduğu belirtilmiştir (18). Kopeptin arjinin vazopressin hormonun prekürsörünün C terminal fragmanıdır. Kopeptinin de proadrenomedüllin gibi KY'nin klinik değerlendirilmelerinde kullanılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur (18). Oksidatif stres sol ventrikülün yeniden şekillenmesi ve yetmezliğine katkıda bulunmuş, kronik ve ilerleyici sol ventrikül fonksiyon

bozukluğuna neden olarak konjestif kalp yetmezliğine (KKY) dönüşümün nedenlerinden olmuştur (19-23). Dolayısıyla yapılan birçok çalışmada KY'nin durumunu değerlendirmek için oksidatif stres belirteçleri ölçülmüştür (7, 19-23).

Bildiğimiz kadarıyla literatürde düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY hastlarında BNP ile proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidatif stres parametreleri arasındaki korelasyonu inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu konuyla ilgili BNP'nin, orta-bölge pro-A tipi Natriüretik peptid, orta-bölge proadrenomedüllin ve kopeptin ile akut kalp yetmezliği hastalarında 1 yıllık mortaliteyi öngörebilmesi gibi bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada akut KY'li hastalarda orta-bölge pro-A tipi Natriüretik peptid, orta-bölge proadrenomedüllin ve kopeptinin BNP'ye göre 1 yıllık mortaliteyi tahmin edebilme duyarlılıkları ve özgülükleri araştırılmıştır (24). Sonuç olarak kopeptin ve orta-bölge proadrenomedüllin, akut kalp yetmezlikli hastalarda 1 yıl içerisinde tüm nedenlere bağlı ölümleri öngörmede BNP ile karşılaştırınca pozitif yönde anlamlı korelasyon göstermişlerdir (25).

Bu çalışmanın amacı düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarında BNP ile proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiyi incelemek ve aynı zamanda bu parametrelerin BNP'nin yerine ya da BNP ile beraber kullanımının klinik açıdan faydası olup olmayacağını ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Yetmezliği

2.1.1. Kalp Yetmezliği Tanımı

Kalp yetmezliği bir hastalık değil, birçok farklı nedene bağlı olarak ortaya çıkabilen bir klinik tablodur. Yani belirtiler ve fiziksel bulgular bileşkesi olan bir sendromdur (14). Thomas Lewis tarafından yapılan bir tanımlamada “Kalbin muhteviyatının yeterince boşalamaması durumudur” olarak geçerken, Paul Wood, “Kalbin vücudun ihtiyacı için gereken yeterli dolaşımı sağlayamaması durumudur” tanımlamasını yapmıştır (4). KY, bütün kalp ve damar hastalarının ölümünden bir önceki basamağıdır. Fizyopatolojik açıdan KY, kalbin kasılma ve/veya gevşeme gücünün bozulduğu veya birim zamanda pompaladığı kan miktarının normalin altına indiği durumlar olarak tanımlanır. Avrupa Kardiyoloji Derneğinin (ESC) tanımına göre klinik olarak KY, kalpteki yapısal veya işlevsel bozukluktan kaynaklanan, hastalarda tipik belirti (nefes darlığı, ayak bileğinde şişme ve halsizlik gibi) ve bulguların (artmış jugüler ven basıncı, akciğerde krepitasyon ve kalp tepe atımının yer değiştirmesi gibi) görüldüğü klinik bir sendromdur (14).

2.1.2. Kalp Yetmezliği Epidemiyolojisi

Kalp yetmezliği insidansı hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde giderek artmaktadır. Yaş ilerledikçe KY görülme sıklığında ciddi artış görülmektedir. Framingham Kalp Çalışması’nda 40 yaş sonrası dönemde, KY gelişme riski %20 bulunmuştur (26). Yine bu çalışmada cinsiyet farketmeksizin KY dahil kardiyovasküler hastalıkların (KVH) insidansının giderek arttığı belirtilmiştir. KY görülme sıklığı genel nüfusta %1-3 iken, 70 yaş sonrası % 10’a, 80 yaş sonrası %15-20’lere çıkmaktadır (27). Genel olarak KY yeni olgu görülme hızı yılda 1-5/1000 iken, 65 yaş üzerindeki olgularda 20/1000 ve 80 yaş üzerinde 80/1000 olarak bildirilmektedir (26). Durağan seyirli KY hastalarında bir yıllık genel mortalite % 7,2; ileri evre olanlarda % 13,5; 5 yıllık mortalite oranı ise yaklaşık % 50’dir (28-31). Kalp yetersizliği nedeniyle hastaneye yatırılan hastaların seyirleri de kötüdür. Güncel kayıtların incelenmesinde hastaneye yatış gereksinimi olan KY hastalarında mortalite oranı %17,4 olarak belirtilmiştir (31). Hipertansiyon, diabetes mellitus (DM), obezite, kalp damar hastalığı, kronik akciğer hastalığı, kronik böbrek yetmezliği, kalp kapak hastalığı, kalp ritim

bozuklukları, kalp kası hastalığı veya doğumsal kalp hastalığı KY'ye zemin hazırlayan durumlardır (1-3, 14, 26, 27). Bu hastalıkların zamanında tespiti KY'ye gidişi önlemekte ve KY'yi önlenebilir hastalıklar sınıfına sokmaktadır.

2.1.3 Kalp yetmezliği risk faktörleri ve nedenleri

Framingham Kalp Çalışmasına göre, cinsiyet farketmeksizin, her beş kişiden birinin KY'ne yakalanma olasılığı vardır (32). Günümüzde KY'nin en önde gelen nedeni koroner kalp hastalığıdır (KKH) (14). KY, genellikle koroner arter hastalıklarından miyokard infarktüsü sonrasında gelişse de infarktüs olmadan da KY gelişebilmektedir. İkinci önemli KY nedeni ise hipertansiyon ve hipertansiyonun kalp üzerine olumsuz etkileridir (33). Bu iki nedenin dışında, nispeten nadir görülen çok sayıda hastalık KY'ye neden olabilir. Örnek olarak ilaç yan etkileri, toksinler, enfeksiyonlar, metabolik nedenler, hatta obezite KY'ne neden olabilir (14, 26-34). Bazı durumlar da KY'ye neden olmalarının yanında KY yatkınlığı olanların KY'ye gidişine katkıda bulunabilmektedirler (14).

KY gelişme riski, genellikle kalbin iş yükünün artmasına neden olan kalp damar hastalığı hipertansiyon, kalp kapak hastalığı, kardiyomiyopati veya miyokardit ve konjenital kalp hastalığı gibi durumlarda artar. Yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda, ileri yaşa ek olarak obezite, hipertansiyon, diyabet ve kronik böbrek yetersizliği de KY için majör risk faktörleri olarak bildirilmiştir (14).

Tablo 2.1: ESC (Avrupa Kardiyoloji derneği) 2016 kılavuzuna göre KY nedenleri (35)’ten alınmıştır.

Kalp kası hastalıkları		
İskemik kalp hastalıkları	Miyokardial skar	
	Miyokardial stunning/hibernasyon	
	Epikardial koroner arter hastalığı	
	Anormal koroner mikrosirkulasyon	
	Endotelial bozulma	
Toksik hasar	Madde kötüye kullanımı	Alkol, kokain, amfetamin, anabolik steroidler
	Ağır metaller	Bakır, demir, kurşun, kobalt
	İlaçlar	İmmün düzenleyici ilaçlar, antidepresanlar, antiaritmikler, non-steroid antiinflamatuvarlar, anestezi ilaçları
	Radyasyon	
İmmün aracılı inflamatuvar hasar	Enfeksiyon ilişkili	Bakteri, mantar, parazit, spiroket, virüs, protozo
	Enfeksiyon olmadan	Lenfositik/dev hücreli miyokardit, eozinofilik miyokardit, otoimmün hastalıklar (graves, romatoid artrit, sistemik lupus eritematosus)
İnfiltrasyon	Maligniteye bağlı	Direkt infiltrasyon ya da metastaz
	Malignite dışı nedenler	Amiloidozis, sarkoidoz, hemakromatozis, glipjen depo hastalıkları, lizozomal depo hastalıkları
Metabolik bozukluklar	Hormonal	Tiroid hastalıkları, paratiroid hastalıkları, akromegali, büyüme hormonu eksikliği, hiperkortizolemi, addison hastalığı, conn hastalığı, diyabet, metabolik sendrom, feokromasitoma
	Beslenme	Tiamin, L-karnitin, selenyum, demir, fosfatı kalsiyum eksiklikleri, obezite
Genetik anormallikler	Çeşitli formlar	Hipertrofik ve dilate kardiyomiopati, sol ventrikül bozuklukları, aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiopatisi, restriktif kardiyomiopati, musküler distrofiler, laminopatiler
Anormal dolum durumları		
Hipertansiyon		
Kapak ve miyokard yapısal defektleri	Doğumsal	ASD, VSD
	Kazanılmış	Triküspit, aort, mitral ve pulmoner kapak hastalıkları
Perikardiyal ve endomiyokardiyal patolojiler	Perikardiyal	Konstriktif perikardit, perikardiyal efüzyon
	Endomiyokardiyal	Endomiyokardiyal fibrozis, endokardial fibroelastosis
Artmış debi durumları		Ciddi anemi, sepsis, tirotoksikoz, Paget hastalığı, gebelik
Volüm fazlalığı		Böbrek yetmezliği, iyatrojenik sıvı fazlalığı
Aritmiler		
Taşiaritmiler		Atriyal, ventriküler aritmiler
Bradikaritmiler		Sinüs nod fonksiyon bozukluğu, ileti bozuklukları

2.1.4. Kalp Yetmezliği Evrelendirilmesi

Kalp yetmezliği ile ilgili başka önemli bir kavramda KY'nin evrelendirilmesidir. Amerikan Kalp Birliği (AHA) tarafından ortaya konulmuş ve Avrupa kardiyoloji derneği tarafından da kabul edilmiş ortak bir evrelendirme sistemi mevcuttur (13). Bu evrelendirmeye göre KY için yüksek riskli olup yapısal kalp hastalığı ve KY semptomu olmayan hastalar evre A, yapısal kalp hastalığı olup ama KY bulgusu ve semptomu olmayan hastalar evre B, yapısal kalp hastalığı ile beraber önceden ve hala devam eden KY semptomları olan hastalar evre C, dirençli ve tekrarlayan hastane yatışı olan hastalar evre D olarak belirtilmiştir (13). Aynı zamanda New York Kalp Birliği tarafından fonksiyonel kapasitenin değerlendirildiği bir sınıflama da yayınlanmıştır (13). Bu sınıflamada ise kardiyak hastalığı olan ancak fiziksel aktivitesi kısıtlanmayan hastalar evre 1, Kardiyak hastalığı olan ve fiziksel aktivitenin hafif kısıtlanmasına neden olan hastalar evre 2, Kardiyak hastalığı olan ve fiziksel aktivitenin belirgin kısıtlanmaya neden olduğu hastalar evre 3, Kardiyak hastalığının fiziksel aktiviteyi tamamen engellediği hastalar evre 4 olarak belirtilmiştir (13). Ventrikül fonksiyonuna göre ise KY ikiye ayrılır. Birincisi düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp kasının kasılmasının bozulduğu sistolik kalp yetmezliği, diğerisi ejeksiyon fraksiyonunun korunduğu ventrikül doluş bozukluğunun olduğu diastolik kalp yetmezliğidir. Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC)'nin 2016 yılında yayınladığı kılavuza göre sol ventrikül EF $\geq$ %50 ise korunmuş ejeksiyon fraksiyon, sol ventrikül EF $<$ % 40 ise düşük ejeksiyon fraksiyon olarak tanımlanmıştır. % 40-49 arası değerler gri bölge olarak belirtilmiştir (35).

2.1.5 Kalp Yetmezliğinde Tanı

KY hastalarına tanının erken zamanda konulması, hastalığın seyrini yavaşlatarak, ölüm riskini, hastaneye yatışı ve ilerlemiş olgularda kullanılan maliyeti yüksek tedavi seçeneklerine gereksinimi azaltır. Ancak KY belirtilerinin KY'ye özgül olmaması nedeniyle tanı koymak çoğu zaman güçleşebilmektedir (14). Kalp yetmezliğinde ilk olarak risk faktörü bulunan hastalarda tanısals algoritma takip edilmekte ve tarama amaçlı biyobelirteçler kullanılabilmektedir. Özellikle natriüretik peptidler, negatif öngördürücü yani tanıyı dışlayıcı özellikleri ile KY tanısında kullanılan kilit taşı biyobelirteçlerdir (14). KY belirtilerinin çoğu su ve tuz tutulumuna bağlı olduğu için ve bu belirtiler diüretik tedaviyle hızla dzelebileceğinden, bu tedaviyi almakta olan hastalarda belirtiler görülmeyebilir. Bunun yanında KY'de altta yatan organik bir nedenin tanınması çok önemlidir. KY genellikle kalp kasının bir bozukluğu olarak görülse de kalp kapak hastalıkları, ritm ve ileti bozuklukları da

önemli KY etyolojik sınıfını oluşturmaktadırlar. Bu organik nedenlerin belirlenip tedavinin düzenlenmesi hastanın prognozu ve mortalitesi açısından büyük önem arz etmektedir. Sadece ekokardiyografik görüntüleme ile değil gerekli olduğu durumlarda miyokard sintigrafisi ve kardiyak manyetik rezonans görüntüleme de KY tanısının konulmasında kullanılabilmektedir.

Tablo 2.2: ESC (Avrupa Kardiyoloji Derneği) 2016 kılavuzuna göre KY belirti ve bulguları (35)’ten alınmıştır.

Kalp yetmezliği belirtileri	Kalp yetmezliği bulguları
Tipik belirtiler	Özgül bulgular
Nefes darlığı	Juguler venöz basıncın yükselmesi
Ortopne	Hepatojuguler reflü
Paroksizmal nokturnal dispne	3. kalp sesinin duyulması
Egzersiz toleransında azalma	Kalp tepe atımının yerdeğiştirmesi
Yorgunluk, egzersiz sonrası toparlama zamanının artması	
Ayaklarda şişlik	
Zayıf belirtiler	Daha az özgüllükte bulgular
Gece öksürüğü	Haftada 2 kilogramdan fazla kilo alımı veya kilo kaybı
Hırıltı	Plevral efüzyon, periferik ödem,doku kaybı (kaşeksi),
Şişkinlik hissi	Pulmoner krepitasyon, taşikardi,
İştah kaybı	Düzensiz nabız, takipne,
Bilinç bulanıklığı	Cheyne-Stokes solunumu, hepatomegali, assit
Depresyon	Soğuk ekstremiteler,
Çarpıntı	Zayıflayan nabız
Baş dönmesi	Oligüri
Bayılma	

tedavisinde anjiotensin konverting enzim inhibitörleri, aldosteron reseptör blokörleri, ivabradin, beta reseptör blokörleri, diüretikler, dijital glikozidler, damara özgül bazı kalsiyum kanal blokörleri kullanılabilmektedir. Aynı zamanda düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY’de cerrahi olmayan implante kardiyoversiyon ve defibrilatör tedaviler de uygulanabilmektedir.

2.1.7 Kalp Yetmezliğinde Prognoz

KY ilerleyici bir hastalıktır ve günümüzde bu ilerleyişin önlenmesi ve tedavi edilmesi noktasında girişimsel olan ya da olmayan birçok tedavi imkanı bulunmaktadır. Bu gelişen tedavi imkanlarına rağmen KY birçok kanserden daha fazla mortaliteye sahiptir (30). Hastaların ölüm ve sağkalımlarını belirleyen prognostik faktörler, hastanın izlemine dair klinik kararları verirken değişen önemlere sahiptir. Bugün için laboratuvar ve klinik olarak birçok prognostik faktör literatürde yerini almıştır.

Cinsiyetin KY prognozu üzerine etkisi tartışmalı ama genel olarak KY’li kadınlar erkeklere göre daha iyi prognozludur (38). Irk olarak siyah ırkta ölüm oranları daha yüksek çıkmıştır (39). Yaş KY açısından en önemli prognostik faktörlerden biridir. Yapılan bir çalışmada genç grupla karşılaştırılan yaşlı hastalarda ölüm oranının % 13’ten % 42’ye çıktığı gözlenmiştir (40). Birçok çalışmada kalp yetmezliğinin iskemik nedene bağlı olmasının da ölüm oranını artırdığı görülmüştür. Bu durum iskemik olmayan nedenlerin daha genç yaşta görülmesi ve hastaların çoğunluğunun kadın olmasına bağlanmıştır (41). KY renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi, adrenerjik sistem ve inflamasyonun da aktifleştiği bir durum olduğu için birçok biyokimyasal parametrede değişiklikler olmuştur. Bu biyokimyasal parametrelerden norepinefrin, renin, arjinin vazopressin, beyin natriüretik peptid, atrial natriüretik peptid, aldosteron, endotelin-1, C reaktif protein, eritrosit sedimentasyon hızı başlıca kötü prognozu gösteren belirteçler olmuşlardır. Oksidatif stresin göstergesi olarak okside-LDL kolesterolün ve ürik asit düzeylerinin artması da kötü prognoza gidişatı gösteren belirteçlerdir. Artan troponin seviyeleri hem iskemik hemde iskemik olmayan KY hastalarında prognozu kötü yönde etkilemiştir. Anemi KY’de bağımsız kötü prognostik faktör olarak rol oynamaktadır (42). Böbrek fonksiyonlarında bozulma KY’nin prognozuyla doğrudan ilişkili bulunmuştur. KY ile kliniğe gelen hastaların çoğunda böbrek hastalıklarına sıklıkla rastlanmaktadır. Böbrek fonksiyonlarındaki bozulma KY tedavisi için verilen ilaçların durumunu da etkilediği için ayrıca mortalite ve morbiditeyi etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışma böbrek fonksiyonlarındaki bozulmanın sol ventrikül disfonksiyonu olan hastaların mortalitesini arttırdığını göstermiştir (43). Kaşeksi KY hastalarının % 8-12’sinde görülmektedir. Kaşeksi

prognuzu kötü etkilemektedir fakat etkili bir tedavisi bulunmamaktadır (44). KY hastalarının fonksiyonel kapasiteleri NYHA (New York Heart Association) verilerine göre hastalardan alınan bilgiler doğrultusunda subjektif olarak değerlendirilmektedir. Evreler ilerledikçe sağkalım oranları düşüş göstermiştir (45). Ejeksiyon fraksiyonu, sistolik volümün diyastol sonu volüme oranıdır ve iyi bir sistolik fonksiyon göstergesidir. EF'nin % 45'in altında azalan değerleri için anlamlı mortalite artışı gelişmektedir (46).

2.2 Natriüretik Peptitler

Natriüretik peptitler; kalp, beyin ve diğer organlarda sentezlenen nörohormonlardan oluşmaktadır (47). ANP'nin keşfiyle birlikte kalbin kan basıncı, kan hacmi ve elektrolit dengesi ile ilgili endokrin fonksiyonu da keşfedilmiş oldu (48). ANP'nin keşfi üzerine ilk incelemeyi Kisch 1956 yılında kalpte elektron yoğun cisimcikleri gözlemleyerek yapmıştır (49). 1979 yılında de Bold bu cisimciklerin dehidrasyon durumunda azaldığını tuz yüklemesi akabinde arttığını bildirmiştir (50). ANP 1983 yılı sonunda yine de Bold tarafından rat atrial dokusundan ve 1984 yılında Matsuo ve Kangawa tarafından insan atriumundan izole edilmiştir (51, 52).

ANP gibi natriüretik ve diüretik etkileri olan BNP ve CNP (C-tipi natriüretik peptit) domuz beyninden sırasıyla 1988 ve 1999 yıllarında izole edilmiştir (53, 54). Natriüretik peptitler kan basıncı ve kan hacminin düzenlenmesinde görev almalarının yanısıra vücutta birçok biyolojik olayda görev almaktadırlar. Çeşitli patolojik durumlarda da düzeyleri yükselebilmektedir. Natriüretik ve diüretik etkilerinin yanında hipotansif, anti-aldosteronejenik, anjiyogenik, anti-fibrotik ve damar geçirgenliğini artırıcı etkileri bulunmaktadır (48).

2.2.1 B-tip Natriüretik Peptit

İlk olarak beyin dokusunda bulunduğu için beyin natriüretik peptit diye de isimlendirilmektedir. Kalp dokusunda beyinden daha yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. BNP başta 132 aminoasit içeren prepro-BNP olarak sentezlenir. Bu preprohormonun 24 aminoasitlik kısmının proteoliz ile ayrılması ile 108 aminoasitlik pro-BNP oluşur. Tekrar eden proteoliz ile 32 aminoasitlik C terminal parçası ve 76 aminoasitlik N terminal parçası NT-pro-BNP (N terminal pro-BNP) oluşur. C terminal BNP aktivitesinden sorumludur. NT-pro-BNP ise inaktif kısmı oluşturmaktadır. Kanda bulunan BNP ve NT-pro-BNP düzeyleri eşit konsantrasyonlardadır. BNP ve NT-proBNP ventriküllerin geriliminde artış ve çeşitli

nörohormonal faktörlerin uyarısıyla ventrikül miyokard hücresinden ve muhtemelen bir miktar da direkt olarak perimiyokardiyal bölgedeki fibroblastlardan, koroner sinüsler aracılığıyla pulsatil olarak, dolaşıma salgılanır. BNP'nin yarı ömrü yaklaşık 20 dakikadır; NPR (Natriüretik peptid reseptörleri) aracılı endositoz, dolaşımda nötral endopeptidaz veya renal atılım yolu ile metabolize olur. NT-proBNP'nin yarı ömrü ise daha uzundur. Yaklaşık 90 dakikadır. NT-pro-BNP pasif renal atılım ve endotelial retikulum sistemi gibi yollarla yavaş ve pasif olarak metabolize olur. NT-proBNP idrarda daha yüksek olmak kaydıyla hem BNP hemde NT-pro-BNP idrarda bulunabilmektedir. BNP etkisini endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, kalp, adrenal bez ve böbrekte bulunan NP reseptörlerine (NPR) bağlanarak gösterir. BNP'nin sodyum atılımını artırıcı (natriürez), periferik arterlerde dilatasyon yaparak kardiyak dolum basıncını azaltıcı ve glomeruler filtrasyon hızını artırıcı etkileri vardır. Kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsünde BNP düzeyleri ANP'ye göre daha fazla artmaktadır.

Yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığı gibi fizyolojik faktörler BNP'nin plazma düzeylerini etkiler, artan yaşla birlikte muhtemelen kardiyak değişikliklere bağlı olarak plazma BNP düzeyleri artar. Kadınlarda BNP düzeyleri erkeklere kıyasla, muhtemelen hormonal faktörlerle ilişkili olarak biraz daha yüksek olduğu görülmüştür (55). Ayrıca obez kişilerde BNP düzeyleri BNP üretiminin azalması ve BNP klirensinin artması nedeniyle normal kilolu kişilere kıyasla %30-50 daha düşük çıkmıştır (55). Tüm bu faktörler içine alarak yapılan çalışmada normal kardiyak fonksiyonlara sahip nefes darlığı olan hastada BNP için 100 pg/ml konsantrasyonunun negatif öngördürücü değeri % 96 olarak bulunmuştur (55). BNP kalple ilgili ve kalp dışı birçok nedene bağlı olarak yükselebilir. Kalple ilgili nedenlerin başında kalp yetmezliği ve akut koroner sendromlar gelir. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu değerleri ile BNP arasında belirgin bir ilişki vardır. Ejeksiyon fraksiyonu ne kadar düşüğe natriüretik peptid düzeyleri de o kadar yüksek çıkmıştır (56). Cheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dekompanse KY hastalarında günlük BNP düzeylerinin 30 günlük takibinde 430 pg/ml altında seyreden değerlere sahip olan hastaların hastaneye tekrar yatış oranlarında düşüş izlenmiştir (57).

Sol ventrikül diyastolik fonksiyon bozukluğu, hipertansiyon (sol ventrikül hipertrofisi) ve kapak hastalıkları (aort darlığı, mitral yetersizliği) diğer başlıca BNP artışı nedenleridir. Ayrıca kalp ritim bozuklukları da plazma natriüretik peptid düzeylerinde artışa yol açabilir. Kalbe bağlı olmayan nedenler arasında pulmoner embolizm, pulmoner hipertansiyon (primer ya da sekonder), sepsis (muhtemelen doku hipoksisi ya da sekonder miyokard depresyonuna

bağlı olarak), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (cor pulmonale ya da solunum yetersizliği ile birlikte) ve hipertiroidi yer alır.

KY tanısının birinci aşamasında fizik muayene ile değerlendirilen hasta, ikinci aşamasında EKG, telekardiyografi ve BNP düzeyleri ile değerlendirilir. EKG ve telekardiyografide KY lehinde bulgular olması KY tanısını destekler. BNP düzeylerinin yüksek olması yine tanıyı destekleyici faktör olarak yerini alır. Ama KY tanısını kesin olarak koydurmaz. BNP düzeylerinin normal olması ise KY tanısını büyük ölçüde dışlamaktadır. Yapılan bir çalışma bu görüşü desteklemekle beraber KY tanısının sistolik veya diastolik olarak ayrılmasında BNP'nin yetersiz kaldığını belirtmiştir (55).

BNP KY tanısının yanında KY prognozunda da önemlidir. KY hastalarının başlangıçtaki durumları ve NYHA sınıflamasına göre kliniklerinin şiddetli olduğu durumlarda bile düşük BNP düzeyleri daha iyi bir prognozu göstermiştir (56).

Acil servislerde de kalp yetmezliği hastalarının ayırıcı tanısında ve takibinde BNP çok yararlı bir belirteçtir. Acil servise akut dispne şikayeti ile gelmiş hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada artmış BNP düzeylerinin ($>100\text{pg/ml}$) KY tanısında duyarlılığının % 86, negatif prediktif değerinin % 96 olduğu saptanmıştır (55). Aynı çalışmada sol ventrikül sistolik fonksiyon bozukluğu olan KY hastalarında sistolik fonksiyon bozukluğu olmayanlara kıyasla BNP düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (55). Başka bir acil servis çalışmasında ise akut dispne tanımlayan hastaların KY ciddiyetinin hekimler tarafından BNP düzeylerinin bilinmeden değerlendirilmesinin, hastaların BNP düzeyleri ile takip edilmesine kıyasla eksik kaldığı görülmüştür (56).

BNP KY hastalarının mortalitesini öngörmede de kullanılan bir belirteçtir. BNP ile hasta izlemi genellikle, bazı hastalar için hastaneye yatırıldıktan sonra veya bir ilaç alımının sorunlu olması durumunda yapılmaktadır. Hastaların takibinde BNP temelli tedavi seçenekleri oluşturmak mortalitelerini BNP'nin kılavuzluğunda takip etmek ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. BNP temel alınarak tüm nedenlere bağlı KY mortalitesini inceleyen çalışmalarda kısa süreli takiplerde BNP takibinin mortaliteyi azalttığı görülmüştür. Ancak uzun süreli çalışmalarda belirsiz sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle Avrupa Kardiyoloji Derneği tarafından natriüretik kılavuzluğunda takip önerilmemiştir (58).

2.3 Adrenomedüllin

Kardiyovasküler sistemde BNP dışında da düzenleyici rolü olan vazoaktif peptidler bulunmaktadır. Bunlardan proadrenomedüllin (PROADM), adrenomedüllin (ADM) adlı peptidin prekürsörü olarak bulunmuştur. Adrenomedüllin 1993 yılında yapılan sıçan trombosit hücrelerinde cAMP (siklik Adenin Mononükleotit Fosfat) düzeylerini HPLC (yüksek basınçlı likit kromatografi) tekniği ile araştıran çalışma sırasında bulunan bir peptittir (59). Peptid ilk olarak feokromasitoma dokusundan izole edilmiştir. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda feokromasitoma dışındaki dokularda bulunabildiği gösterilmiştir. Günümüzde adrenomedüllin, dolaşımda bulunan ve biyolojik aktivitesi olan parakrin etkili bir hormon olarak değerlendirilmektedir (60).

52 amino asitten oluşan peptid, bir intramoleküler disülfid bağı içerir ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) ile hafif homoloji göstermektedir. Adrenomedüllin öncülü, 185 aminoasitten oluşan preproadrenomedüllin adı verilen peptittir. Bu öncül peptidin yapısından aminoasitlerin ayrılması sonucunda başta proadrenomedüllin sonrasında olgun olmayan adrenomedüllin oluşmaktadır. Enzimatik yıkımla devam eden süreç sonunda olgun adrenomedüllin oluşmaktadır (16). Bu işlemlerden önce ADM'yi çevreleyen 2 peptid yapı daha bulunmaktadır. Bunlar orta bölge proadrenomedüllin (Mid Regional-ProADM) ve proadrenomedüllinin karboksi terminal kısmıdır (61). Preproadrenomedüllini kodlayan gen adrenomedüllin geni olarak adlandırılır ve 11. kromozomda lokalizedir (62).

Çok hızlı olarak üretilen adrenomedüllin depolanmadan hücreden sentezlendiği gibi salgılanmaktadır. Ancak endokrin pankreas ve adrenal medulla hücrelerinde depolanabileceği öne sürülmüştür (63). Adrenomedüllin kanda spesifik olarak adrenomedüllin bağlayan protein-1 (AMBP-1) adı verilen bir protein tarafından taşınmaktadır. Bu protein aynı zamanda kompleman faktör H olarak da tanımlanmıştır (64). Dolaşımdaki adrenomedüllin metabolizmasının hızlı ve yarılanma ömrünün 20 dakika olduğu tespit edilmiştir (65).

Adrenomedüllinin plazma konsantrasyonu 2-3 pikomolar düzeyindedir. Konsantrasyonu yaş ve cinsiyete göre değişmemektedir (66). TNF- α , TNF- β , IL-1, sitokinler, tiroid hormonları, kortikosteroidler, anjiyotensin II, aldosteron, noradrenalin, endotelin-1, ANP gibi hormonlar, P maddesi, doku plazminojen aktivatörü ve bradikinin adrenomedüllinin sekresyonunu ve üretimini kuvvetli bir şekilde uyarmaktadırlar (67-74). Hayvan çalışmasında kardiyak mekanik gerilmenin adrenomedüllin mRNA'sını arttırdığı gösterilmiştir (75). Fetal serum,

TGF- β 1, vazoaktif intestinal peptid ve trombin adrenomedüllini güçlü şekilde inhibe etmektedirler (76, 77). Adrenomedüllin de noradrenalin, anjiotensin II ve aldosterona karşı antagonist etki göstermektedir (67-69, 75-80). ADM kalp kası hücresi, vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, renal distal ve toplayıcı tübüller, sindirim sistemi mukozal ve glandüler epitel hücreleri, solunum yolu epiteli, genitoüriner sistem epiteli, endokrin ve nöroendokrin sistemlerde, hipotalamusta supra-optik nükleus ve paraventriküler nükleusun magnoselüler alanında, kanda, idrarda, beyin omurilik sıvısı ve amniyon sıvısında tespit edilmiştir (81).

Adrenomedüllin CGRP reseptörlerine benzer plazma membran reseptörlerine bağlanmaktadır. En iyi bilinen CGRP/ADM reseptör kompleksi kalsitonin reseptör benzeri reseptör (CRLR)'dür (82). Bu reseptörün işlevselliği için hücre membranında bulunan reseptör aktivite düzenleyici protein (RAMP) adı verilen bir proteine ihtiyaç vardır. RAMP'lar serpentin reseptör ailesinin bir üyesi olup CRLR'ün hücre membranına yapışması, farmakolojik özgüllüğün sağlanması, G proteinleri ile fonksiyonel etkileşme gibi önemli fonksiyonlar göstermektedir (83). RAMP'lar tip 1, 2 ve 3 olmak üzere 3 tiptir (84). CRLR/RAMP1 kompleksi; CGRP reseptör özelliği, CRLR/RAMP2 ve CRLR/RAMP3 kompleksleri ise ADM reseptör özelliği göstermektedir (85). ADM hücrel etkisini oluşturmada ikinci haberci olarak genellikle cAMP (siklik adenosin monofosfat) yolağını kullanır (86). Aynı zamanda nitrik oksit (NO)/cGMP (siklik guanosin monofosfat), inozitol trifosfat ve ATP duyarlı potasyum kanalları üzerinden de etkisini oluşturmaktadır (87-89). NO/cGMP yolağı vazodilatatör etkisi yanında aynı zamanda antiproliferatif, antimitotik, antiapoptotik aktivitesinden ve oksidatif stresi düşürücü etkisinden sorumludur (90, 91). ADM ayrıca protein kinaz A üzerinden mitojen aktive eden kinazlar (MAPK)'ları regüle ederek hücre proliferasyonunu düzenlemekte ve bu etkisinin endotel disfonksiyonunda önemli olduğu düşünülmektedir (92).

Adrenomedüllinin kardiyovasküler sistemdeki birincil etkisi sistemik vasküler rezistansı düşürerek hipotansiyon yapması ve buna bağlı olarak gelişen kardiyak outputu artırmasıdır (93). Adrenomedüllinin vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu iki yönlü olarak düzenlediği belirtilmiştir. Herhangi bir uyaran olmadığında vasküler düz kas hücre proliferasyonunu stimüle ederken, PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü) veya fetal serum tarafından indüklenen proliferasyonu inhibe etmektedir (94). Adrenomedüllinin

vasküler düz kas ve endotel hücrelerine olan bu etkileri nedeniyle arteriyel hipertansiyon veya anjioplasti sonrası restenoz gelişiminde oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

Adrenomedüllinin plazma konsantrasyonunun çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda arttığı gözlenmiştir. Primer arteriyel hipertansiyonlu hastalarda, aterosklerozda, miyokard infarktüsü sonrasında ve sol ventrikül hipertrofisi ile nefroskleroz gibi hipertansiyon komplikasyonu olan kişilerde normalden daha yüksek bulunmuştur (95). Hipertansiyonda adrenomedüllinin artması peptidin natriüretik ve vazodilatatör özellikleri ile miyokardiyal yüklenmeyi azaltarak koruyucu rol oynamakta ve bu şekilde miyokardiyal hipertrofiyi de sınırlandırmış olmaktadır (96). Bu yüzden plazma adrenomedüllinin β -adrenerjik antagonistlerle tedavide hastalara yardımcı olabileceği düşünülmektedir (97). Miyokarddaki hacim artışında ADM yükselmesinin hipoksi, miyositlerin mekanik gerginliği, endotelin-1 ve Ang II ile ilgili olabileceği ileri sürülmektedir (98, 99).

Ateroskleroz plağındaki makrofajlarda da tespit edilen adrenomedüllinin aterogenezi inhibe ettiği (77) ve bu etkisinde vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve endotel hücre apoptozisini inhibe etmesinin, ayrıca antiinflamatuvar etkisinin rol oynadığı düşünülmektedir (94).

Ayrıca, plazma ADM konsantrasyonu miyokard infarktüsünün akut fazında yükselmekte ve 2-3. günde maksimum seviyeye ulaşp 3 haftada normale inmektedir. Bu hastalardaki yüksek peptid düzeyinin kötü prognostik faktör olduğu düşünülmüştür (100). Diğer taraftan ADM aktivasyonunun miyokardiyal iskemide koruyucu olabileceği, miyokard hücrelerindeki oksidatif stresi azalttığı ve lokal koroner vazodilatasyon ile miyokardiyal iskemiye sınırlandırdığı, kardiyomiyositlerin apoptozisini inhibe ettiği, infarkt alanını küçülttüğü, ventriküler fibrilasyon oluşumunu azalttığı, ayrıca kan basıncını etkilemeyen düşük dozda kronik ADM infüzyonunun deneysel olarak oluşturulan miyokard infarktüsünde kardiyak remodelingi inhibe ettiği saptanmıştır (96). Sonuç olarak adrenomedüllinin izole kardiyomiyosit ve kardiyak fibroblastlardan sentez ve sekrete edilmekte olup, miyokardiyal hipertrofi, arteriyel hipertansiyon ve kalp yetmezliğinin iyileşmesini parakrin veya otokrin olarak düzenlediği ileri sürülmektedir (101).

Adrenomedüllindeki sistemik artışların lokal üretim alanından taşması olup olmadığı veya belirli koşullarda artan plazma adrenomedüllinin vasküler dirençte genel bir azalmaya ve kan basıncında bir düşüşe neden olan bir hormonal fonksiyona sahip olup olmadığı belirsizdir.

Adrenomedüllin ile plazma renin aktivitesi, aldosteron konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon, sodyum atılımı, glomerular filtrasyon hızı ve kreatinin klerensi ile negatif korelasyon bulunmuştur (102-104).

Proadrenomedüllin ADM'nin öncülü olan bir peptittir. Adrenomedülline ek olarak proadrenomedüllin amino terminal 20 peptid (PAMP) olarak geçen 20 aminoasit kalıntısından oluşan peptid yapıyı da içermektedir. İlk olarak feokromasitoma tümörü dokusundan izole edilmiş olup yapılan çalışmalarda adrenal bez dokusunda ve kalp atrium dokusunda da bulunduğu tespit edilmiştir (105). Anestezi uygulanan sıçanlara verilen PAMP'ın hipotansif etki oluşturduğu gözlenmiştir (105).

Proadrenomedüllin ve MR-ProADM düzeylerinin ölçümü, daha kararlı bir yapı ve uzun bir yarılanma ömrüne sahip olması nedeniyle ADM ölçümü yerine tercih edilmektedir. ADM'nin birçok kardiyovasküler olayda arttığı görülmektedir. ADM düzeylerinin esansiyel hipertansiyon (106-109), akut miyokard infarktüsü (110, 111), serebrovasküler hastalıklar (112), kalp yetmezliği (17), konjestif kalp yetmezliği (113), preeklampsi (114), hemorajik şok (115), pulmoner hipertansiyon (116), mitral kapak darlığı (108) ve subaraknoid kanamada (117) arttığı görülmüştür (118).

Akut kalp yetmezliğinde biyobelirteçlerin incelendiği BACH çalışmasında MR-ProADM'nin mortalite ile ilişkisi saptanmış ve prognostik değerinin natriüretik peptidlere göre daha iyi olduğu belirtilmiştir (18). Bir başka çalışmada da kısa dönem prognoz açısından MR-ProADM ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (119). NYHA'ya göre sınıflandırılan konjestif kalp yetmezliğinde, sınıf I'den IV'e doğru plazma adrenomedüllin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir, ancak bu ilişkinin, hastalığın farklı evrelerini tanısal açıdan ortaya koymada güçlü olmadığı belirtilmiştir (17, 120).

2.4 Kopeptin

Kopeptin son yıllarda klinik araştırmalara konu olmuş ve olmaya devam eden bir biyobelirteçtir. İnsan vücudunda su homeostazı birçok faktör tarafından düzenlenmektedir. En önemlilerinden biri de arjinin-vazopressin (AVP), diğer adıyla antidiüretik hormondur (ADH). AVP 1. ve 6. aminoasit kalıntıları arasında disülfid bağı olan, karboksil ucu amidleşmiş toplamda 9 aminosit kalıntısından oluşan bir peptid hormondur (121). AVP'nin saflaştırılması çalışmalarında nörofizin adı verilen peptid yapıya kovalent olarak değil ve

stokiyometrik olarak bağı olduğu izlenmiştir (122). Memeli nörofizini 93-95 aminoasit kalıntısından oluşur ve 7 tane disülfid bağı içermektedir. Birkaç omurgalı türünden alınan nörofizinlerin dizilimleri sonrasında arjinin-vazopressin ve oksitosin hormonlarına benzer iki grup ortaya çıkmıştır. Bu spesifik stokiyometrik bağlanma nedeniyle nörofizinin ve bu hormonların ortak bir öncülden geldiği öne sürülmüştür (122). Richter ve meslektaşları tarafından yapılan komplementer DNA (cDNA) izolasyonu çalışmasında prepro-okситosin ve prepro-vazopressin cDNA'ları izole edilerek bu görüş teyit edilmiştir (123). 164 aminoasit içeren prepro-vasopressin kopeptin, sinyal peptidi ve nörofizini de içermektedir. Öncül peptid hipotalamusun paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerinde sentezlenmekte ve aktif hale gelmektedir. AVP, nörofizin II ve kopeptin ile aksonal yolla taşınarak posterior hipofize (nörohipofiz) gelerek depolanmaktadır.

Kopeptin aynı zamanda AVP'ye bağı glukopeptid olarak bilinmekte ve öncül hormonun C-terminal parçasını da içermektedir. İlk olarak 1972'de Holwerda tarafından tanımlanmıştır (124). Kopeptin lösinden zengin çekirdeğe sahip 39 aminoasitten oluşan bir glukopeptittir. AVP ile stokiyometrik olarak sentezlenmesi nedeniyle C-peptid ile insülin arasındaki ilişkiye benzer bir şekilde insan plazması ve serumundaki AVP düzeylerini yansıtmaktadır. AVP'nin kan düzey ölçümleri stabil olmadığından, kopeptin alternatif olarak düşünülmüştür. 2006 yılında kopeptinin immün yöntemle ölçümü tanımlanmıştır (125). Kopeptinin kan alımından günler sonra bile konsantrasyonlarının stabil kalması, kolay ve hızlı bir şekilde ölçülebilir olması AVP'ye göre daha kullanışlı bir belirteç olduğunu ortaya koymuştur (125). Kopeptin konsantrasyonları, serum ve EDTA (etilendiamin tetra asetik asit) içeren tüple ayrılmış plazmada ve serumda oda sıcaklığında en az 7 gün ve 4-8 °C'de 14 gün stabil kalır. Kopeptin ölçümlerinin diğer avantajları arasında az miktarda serum veya plazmanın yeterli olması (50 µL), hızlı sonuç alınması (yaklaşık 3 saatte), yüksek duyarlılık ve preanalitik işlem gerektirmemesi bulunmaktadır (126).

Sağlıklı insanda ortalama plazma kopeptin konsantrasyonu 4,2 pmol/L (referans aralığı: 1–13,8 pmol/L)'dir. Kadınlarda yaş gruplarına göre kopeptin düzeyleri değişmekle beraber düşüktür (3,7 - 5,2 pmol/L arasında değişmekte) (125). AVP'ye benzer şekilde kopeptin de bireye bağı fizyolojik değişikliklerden etkilenmektedir. Uzun süreli açlık ve egzersiz sonrası arttığı, sıvı alımına bağı azalmalar olduğu rapor edilmiştir (125, 127). Roussel ve arkadaşları, genel popülasyonla ilgili yaptıkları geniş bir çalışmada, kopeptin ve AVP arasında iyi bir korelasyon olduğunu kısa süre önce doğrulamışlardır (128). Kopeptin stres hormonu olarak da

bilinmekte ve bireysel stresin bir göstergesi olarak görev yapabilmektedir (129). Kopeptinin stres seviyesinin saptanması açısından yüksek kararlılığından dolayı kortizolden daha güvenilir olduğu belirtilmiştir (129, 130).

AVP'nin yerine kullanılması önerilen kopeptin de kısa sürede GFH (glomerüler filtrasyon hızı)'nın kaybı, böbrek büyüme hızı, albuminüri, renal kan akımı, yaş, cinsiyet ve diüretik kullanımdan bağımsız olarak bozulmuş böbrek fonksiyonunun bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (131-133).

Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada böbrek bağıışı sonrası GFH'de anlamlı değişim olmasına rağmen kopeptin düzeyleri arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Bu da kopeptin konsantrasyonunun GFH'den etkilenmediğini ortaya koymuştur (134).

Kopeptin özgül olmayan bir belirteçtir ancak akut miyokard infarktüsü gibi kardiyak debinin düşmesi ve buna bağlı olarak artan endojen strese yanıt olarak kopeptin düzeyleri erken dönemde artmaktadır. Miyokard infarktüsü için geleneksel kardiyak biyobelirteçler hala önemli bir araç olarak kullanılmasına rağmen diğer belirteçlerin tespit edilmediği durumlarda erken salınması ve hızlı tespit edilmesi kopeptinin avantajı olmuştur (135, 136). Göğüs ağrısı ile ortaya çıkan diğer durumlara kıyasla akut miyokard infarktüsünde kopeptinin önemli ölçüde arttığı birkaç bulgu bildirilmiştir. Bu durum kopeptinin troponin ile beraber kullanılmasının tanısal duyarlılığı artırmasıyla ilişkilendirilmiştir (137). İlginç olarak kararsız anjinal hastalarla iskemik nedenli olmayan göğüs ağrılı hastalar arasında kopeptin düzeyleri benzer çıkmıştır (137). Yine bu çalışmada, kopeptinin PPV (pozitif prediktif değeri) değeri % 34,9 ile % 57,9 arasında değişmiştir. Bu nedenle, tek başına kopeptinin, AMI şüphesi olan hastalarda tek başına tanısal bir belirteç olarak kullanımı önerilmemiştir (137). Bu sonuç sadece nekroz ile giden iskeminin artmış kopeptin salınımını indüklediğini düşündürmüştür (138). Lipinski ve arkadaşlarının toplam 14 çalışmadan oluşan 9224 hasta içeren sistematik derlemesinde tek başına kopeptin kullanımının akut miyokard infarktüsü tanısında küçük bir yeri olduğunu ortaya koymuşlardır (139). Bununla birlikte kopeptin ile troponin kombine ölçümü tanısal duyarlılığı belirgin olarak artırmıştır. Ayrıca, kopeptinin tüm nedenlere bağlı ölüm riski ile ilişkisi gözlenmiştir. Bu nedenle kopeptininin hastanın erken taburculuğu açısından fayda sağlayabileceği düşünülmüştür. İlk prospektif, girişimsel, randomize çalışma olan Kardiyoloji'de Biyobelirteç Çalışması-8'de (BIC-8), copeptin ve troponin negatif hastalar düşük risk olarak kabul edilip acil servisten taburcu edilmiştir (140).

Kronik kalp yetmezliği tanı, prognoz ve klinik ile ilgili durumlarında hala birçok biyobelirteç kullanılmasına rağmen hastaların % 50'sinden fazlasına hala tanı konulamamaktadır (141). AVP periferik damar ve koroner arter damarları kontrakte ederek sistemik damar dirence katkıda bulunmakta, aynı zamanda kardiyak ardyükü, miyokard oksijen ihtiyacı ve sunumunu artırmaktadır. AVP konsantrasyonu kalp yetmezliği hastalarında sıklıkla kardiyak debinin azalması nedeni karotid sinüs ve aortik baroreseptörlerin uyarılması sonucunda artmaktadır. Kısmen de kalp yetmezliği hastalarında sık görülen sodyum düşüklüğüne bağlı osmolalitenin düşmesine ikincil olarak uyarılmaktadır. Kalp yetmezliğinde artan anjitenin II'de AVP'yi artırıcı etki göstermektedir. Stoiser ve arkadaşlarının ilerlemiş kalp yetmezliği olan 268 hastayla ilgili prospektif çalışmalarında, copeptin mükemmel bir prediktif belirteç olarak gösterilmiştir (142, 143). Artmış kopeptin düzeyi olan hastaların anlamlı olarak uzun dönemli prognozları daha kötü seyretmiştir. Kopeptin ölçümleri ölüm oranını tahmin etmede daha üstün iken klinik kötüleşmeyi öngörmeye BNP daha üstün çıkmıştır. Kopeptinin prognostik değeri, akut miyokard infarktüsü sonrası kalp yetmezliği olan hasta popülasyonunda da ortaya çıkmıştır (144). Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda yapılan çalışmada glomeruler filtrasyon hızındaki azalma ile kopeptin ve BNP düzeyi artışları paralel seyretmiştir (145). Bu çalışmalara rağmen kopeptinin ideal kullanımı halen belirsizliğini korumaktadır. Daha verimli sonuçlar için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5 Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller basit olarak dış yörüngelerinde (orbital) bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır (146). Elektronlar, atom çekirdeğinin etrafında, farklı enerji düzeylerine sahip yörüngelerde hareket etmektedirler. Her bir yörüngede en fazla iki elektron (e⁻) bulunmakta ve bu elektronlar birbirlerine zıt yönde ve kendi eksenleri etrafında hareket etmektedirler. Eşlenmemiş elektronlar, serbest radikallerin farklı hücre bileşenlerine karşı artmış reaktivitesinden sorumludur.

Temelde serbest radikaller canlı organizmalarda üç yolla meydana gelmektedir (146). Bunlar radikal olmayan bir atom veya molekülün bir elektron kaybetmesiyle ya da kazanmasıyla, bir kovalent bağın yıkılması sonucu elektronların her birinin moleküller arası paylaşılmasıyla oluşmaktadır. Sonuncusuna homolitik fizyon adı verilmektedir. Örnek olarak H₂O molekülündeki kovalent bağların homolitik fizyon sonucunda yıkılmasıyla H[•] ve OH[•] radikalleri oluşur. Serbest radikaller vücut içerisinde bazı fizyolojik olaylarda rol almalarının

yanı sıra fazla miktarda birikmeden ortamdan hızlıca uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Serbest radikalleri ortamdan uzaklaştıran ya da inaktive eden antioksidan sistemin bozulmasıyla dokularda oksidatif değişiklikler görülmeye başlamaktadır. Bu oksidatif durum lipid peroksit yapıların oluşumuna, proteinlerin denatürasyonuna ve nükleik asitlerin hasarına neden olmaktadır. Bunun sonucunda bu doku bileşenlerinin yapısal ve fonksiyonel özellikleri değişmektedir. Serbest radikallerin diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, respiratuar sistem hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, infertilite, görme bozuklukları ve yaşlanma gibi birçok hastalığın etyolojik, patolojik veya komplikasyonlarının oluşumu sürecinde yer aldığına dair kanıtlar bulunmaktadır (147-152).

2.5.1 Reaktif Oksijen Türleri

Oksijenin yörünge düzleminde π 2p orbitalinde 2 adet eşlenmemiş elektronu olduğu görülmektedir ve bu oksijenin en kararlı halidir (temel durum: ground state). Oksijen bu yapısı nedeniyle diradikal olarak adlandırılır ve diradikal özelliğinin bir sonucu olarak da yüksek derecede ROT oluşturma ve oksidan olarak görev alma eğilimindedir (146). Serbest radikallerin fizyolojik olaylardan ve oksidatif hasardan başlıca sorumlu yapıları ROT'lardır (153). Her ROT serbest radikal fonksiyonu göstermemektedir.

Tablo 2.3: Serbest radikaller ve radikal olmayanlar (146).

Serbest radikaller	Radikal olmayanlar
Reaktif oksijen türleri	Reaktif oksijen türleri
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipobromik asit, $HOBr^a$
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	Hipokloröz asit, $HOCl^b$
Karbonat, $CO_3^{\cdot-}$	Singlet oksijen, $O_2^1 \Delta g$
Peroksil, $RO_2^{\cdot}$	Organik peroksitler, $ROOH$
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot c}$
Karbondioksit $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitrat, $O_2NOO^{\cdot c}$
Singlet oksijen, $O_2^1 \Sigma g^+$	Peroksinitröz asit, $ONOOH^c$
	Peroksinitrik asit, O_2NOOH^c
	Nitrozoperoksikarbonat, $ONOOCO_2^{\cdot-}$
	Peroksomonokarbonat, $HOOCO_2^{\cdot-}$

a: $HOBr$ reaktif bromin ürünü olarak da kabul edilmektedir.

b: $HOCl$ genellikle reaktif oksijen türleri içerisine dahil edilmektedir.

c: $ONOO^{\cdot}$, $O_2NOO^{\cdot}$, $ONOOH$, O_2NOOH genellikle reaktif oksijen türleri içerisine dahil edilmektedir.

Singlet oksijen oksijen molükülünün daha reaktif bir formudur. Yüksek enerji yüklenmesiyle oluşabilmektedir. Singlet oksijenin $O_2^1 \Delta g$ formu radikal değildir. Çünkü eşlenmemiş elektronu yoktur. Ama $O_2^1 \Sigma g^+$ formunda elektronun yörüngedeki hareketi değiştiği zaman oldukça oksidan bir hal almaktadır (146). Süperoksit radikali aerobik metabolizmaya sahip tüm hücrelerde üretilen ilk serbest radikaldir. Kararlı durumdaki oksijenin bir elektron alması sonucu oluşmaktadır. Süperoksit çok reaktif bir radikal değildir. Çeşitli reaksiyonlar sonucu meydana gelen serbest radikal ürünleri sayesinde birçok dokuda oksidatif değişikliklere katkıda bulunmaktadır. Oksidaz ve dehidrogenazlardan oluşan birçok enzim grubu tarafından süperoksit üretimi yapılmaktadır (146).

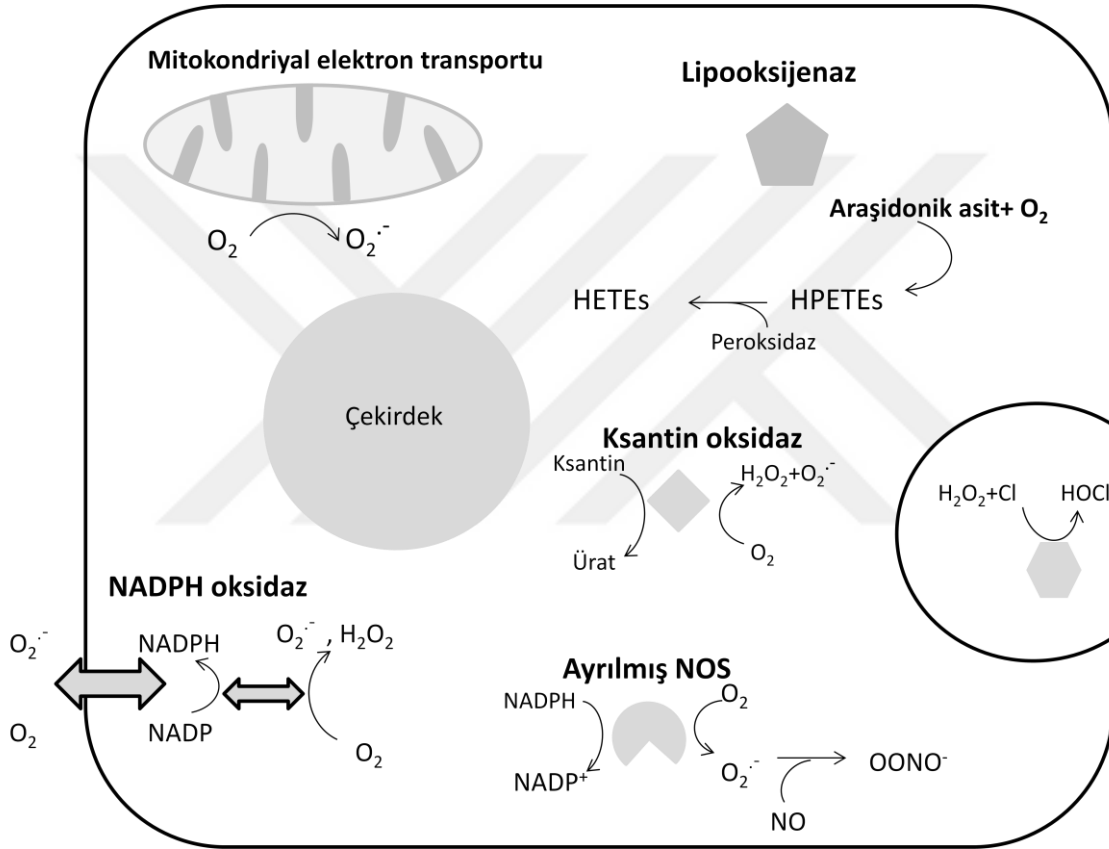
İndirgenmiş geçiş metallerinin oksidasyonu ile de süperoksit oluşmaktadır (154). Sitokrom P450, ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS), triptofan dioksijenaz ve aldehit oksidaz enzimlerinin reaksiyonlarında süperoksit üretilmektedir (146). Önemli süperoksit kaynaklarından biri de aynı zamanda vücuttaki serbest radikallerin en önemli kaynağı olan, mitokondride gerçekleşen elektron taşıma zinciri reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlarda görevli sitokrom oksidazlar yardımıyla oksijene doğru giden elektronlar sonucu, belli bir oranda elektron oksijen molekülüne sızarak süperoksit üretimine neden olmaktadır. Epinefrin, norepinefrin ve dopamin gibi monoaminlerin oksidasyonu sonrasında da süperoksit üretilmektedir. Oksidatif olaylar sonucu tetrahidrobiyopterin azalmasına bağlı olarak endotele bağlı halde bulunan NOS ayrılmakta ve daha az nitrik oksit, daha fazla süperoksit üretimine neden olabilmektedir (155). Süperoksit biyolojik olarak yol açtığı toksisiteyi, başlıca hidroksil radikali oluşumunu artırarak yapmaktadır.

H₂O₂ serbest radikal sınıflamasına dahil edilmemektedir. Ama yüksek reaktiviteye sahip serbest radikal oluşumuna katılmaktadır. H₂O₂ iki yolla oluşmaktadır. Oksijenli ortamda süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlediği reaksiyonla ya da düşük pH'lı ortamda enzimatik olmayan yolla spontan olarak oksijenin 2 elektron alarak indirgenmesiyle oluşabilmektedir (146). H₂O₂'den lökositlerde myeloperoksidaz enzimi yardımıyla güçlü bir serbest radikal olan hipokloröz asit (HOCl) üretilmektedir (156).

OH[•] radikali son derece reaktif bir serbest radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. OH[•] radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca su moleküllerinin iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşmaktadır. OH[•] radikali büyük olasılıkla reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Oluştugu bölgede tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS[•]), karbon merkezli organik radikaller (R[•]), organik peroksitler (RCOO[•]) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur. OH[•] radikali, ultraviyole ışınlarının hidrojen peroksit üzerine homolitik bölünme etkisiyle, ultrasonografi uygulamasının sıvılar üzerine etkisiyle ve liyofilizasyon işlemi sonrasında da oluşabilmektedir (146).

2.5.2 ROT Üretim Yolakları

Günlük kullandığımız oksijenin yaklaşık % 3-5'lik bölümü serbest oksijen radikallerine dönüşmektedir. Bu durum hücrelerde sabit bir ROT kaynağı oluşturmaktadır. Bu ROT'ların bazıları, oksidasyon reaksiyonları gibi normal enzimatik reaksiyonların oluşumu esnasında metal içeren enzimlerin aktif bölgelerinden kazara sızmaları sonucu oluşmaktadır. Bunların dışında hidrojen peroksit gibi, peroksisomlarda oksidazlar tarafından üretilen, fizyolojik rolleri bulunan moleküller de ROT kaynaklarındandır.



Şekil 2.2: Kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi olan bazı ROT'lar ve üretim mekanizmaları. Sugamura ve arkadaşlarının çalışmasına atfen (157).

ROT, genellikle mitokondriyal elektron taşıma zincirinde yer alan NAD^+ , FAD ve koenzim Q (KoQ) gibi pek çok bileşiğin O_2 ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen elektron sızmaları nedeniyle oluşmaktadır. Bunlar arasında da en çok $O_2^{\bullet-}$ üretimi artmaktadır. Bununla beraber çok sayıda anabolik ve katabolik reaksiyonlar sonucunda da ROT üretimi gerçekleşmektedir. Hücrelerde, O_2 kullanan tepkimeleri katalizleyen çok sayıda oksidaz, peroksidaz ve oksijenaz sınıfında enzim bulunmaktadır ve bu enzimler O_2 'ye çeşitli metaller

aracılığıyla elektron aktarmaktadırlar. ROT'ların ana kaynaklarından birisi sitokrom P450 enzim sistemidir. Bu enzimler alkol, ilaçlar ve kimyasal toksinler ile uyarılarak hücre hasarın artışına katkıda bulunmaktadır. Hidrojen peroksit ve lipid peroksitler; peroksizomlar, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunan oksidazlar tarafından enzimatik olarak üretilen bileşiklerdir. Örneğin monoamin oksidaz (MAO), bir nörotransmitter olan dopamini oksidatif olarak parçalayarak H_2O_2 üretmektedir. Peroksizomal yağ asidi oksidaz enzimi, çok uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu esnasında, $FADH_2$ 'den daha çok H_2O_2 oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca lipid peroksitler de ara ürünler olmak üzere, lökotrienler ve prostaglandinler gibi pek çok eikozanoidin sentez yollarında, enzimatik olarak üretilmektedirler. Bunların dışında; ksantin oksidaz, triptofan deoksijenaz, siklooksijenaz ve lipooksijenaz gibi çok sayıda enzimin katalitik döngüsü sırasında da ROT'lar üretilmektedir (158).

2.5.3 Oksidatif Stres

Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır (159). Serbest radikal hasarı ile ilişkisi kanıtlanmış 100'den fazla hastalık durumu tanımlanmıştır (158). ROT'lar vücutta lipid, protein, nükleik asit ve karbonhidrat gibi yapılarla reaksiyona girerek doku hasarı oluşturabilmektedir. ROT'lar bu hastalıkların bir kısmında hastalığın primer nedeni içerisinde yer alırken, diğer durumlarda hastalıkların komplikasyonlarının ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmişlerdir (158).

ROT, özellikle LDL (düşük dansiteli lipoprotein) olmak üzere lipoprotein oksidasyonuna neden olarak, okside-LDL oluşumuna ve okside-LDL'nin katkıda bulunduğu inflamatuvar değişikliklere neden olmaktadır. Bu inflamatuvar değişiklikler ateroskleroz patogeneğinde oldukça önemli moleküllerin oluşumuna yol açmaktadır (160). ROT'ların lipid yapıları üzerindeki en önemli etkilerinden biri de lipid peroksidasyona neden olmalarıdır. Memeli hücre membranları, peroksidatif hasara karşı oldukça duyarlı olan çoklu doymamış yağ asitleri içermektedir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan, zincir tepkimeleri şeklinde süren kimyasal bir süreçtir (161).

Lipit peroksidasyonu başlama, ilerleme, parçalanma ve sonlanma olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır (158). Hidroksil veya diğer radikallerin membran yapısındaki çoklu doymamış lipidlerle reaksiyona girmesi sonucu lipid radikali ($L^{\cdot}$) oluşmaktadır. $O_2^{\cdot-}$ ile devam eden

serbest radikal zincir reaksiyonunda yağ asitinde bulunan çift bağ, kendisine bitişik karbon ile hidrojen arasındaki bağı zayıflattığından dolayı (C-H) hidrojenin koparılması kolaylaşmış olur (162). Dolayısıyla özellikle hücresel membran lipidlerinin çoklu doymamış yağ asiti zincirleri peroksidasyona daha fazla duyarlıdır. Hidrojen kaybeden yağ asiti moleküler olarak yeniden düzenlenir ve konjuge dien yapısı oluşur. Oluşan konjuge dien yapı oksijenle birleşir ve lipid peroksil radikallerine (LOO•) dönüşür. Bu peroksil radikalleri diğer yağ asitlerinden hidrojen kopararak zincirleme peroksidasyon reaksiyonlarını başlatır. Diğer çoklu doymamış lipid yan zincirleri ile tepkimeye giren LOO•, LOOH formuna dönüşmekte ve yeni oksidasyonların başlamasına neden olan L• bileşiklerinin tekrar oluşumuna yol açmaktadır (158). Lipid peroksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan lipid peroksit, siklik peroksit ve siklik endoperoksit gibi lipid peroksit bileşikleri sonuçta ikincil ve son ürünler olan malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) ve hegzanal isimli aldehitlere dönüşür (163, 164).

Lipid peroksit ürünleri ve MDA gibi aldehit yapısındaki moleküllerin derişimleri arttıkça peroksil radikalleri birbirleri ile çapraz kovalent bağlar oluşturarak membran yapısını bozar ve membranı hasara daha duyarlı hale getirir. Biyolojik membranlarda meydana gelen peroksidasyon membran akışkanlığında bozulma, membran potansiyelinde azalma, mebranların H^+ , Ca^{+2} ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğinde artışa yol açarak membranların parçalanmasına ve organel içeriğinin sitoplazmaya salınmasına sebep olur. Bütün bunların sonucunda hücre hasarı veya hücre ölümü meydana gelir (165). Özellikle mitokondri membran hasarı oluştuğunda, daha fazla serbest radikal üretimi gerçekleşmektedir. MDA ve benzer yapıdaki moleküller en toksik olan lipid peroksidasyon ürünleridir ve diğer hücre bileşenlerine de etki ederek hasara neden olmaktadır. MDA çözünebilir halde kanda ve idrarda bulunabilmektedir ve serbest radikal hasarının bir belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (146).

Genellikle hidroksil radikali ile oluşan oksidatif stres sonucunda, reaktif oksijen türleri hücre içi proteinler üzerinde geri-dönüşümlü veya geri-dönüşümsüz oksidatif değişikliklere ve oksidatif hasara yol açar (166, 167). Okside olan proteinlerin yan zincirleri üzerinde karbonil gruplar oluşur. Protein karbonil yapılar aynı zamanda α -amidasyon yolağı ve glutamil yan zincirlerin oksidasyonu sonucunda proteinlerin parçalanması ile de ortaya çıkar (168). Aynı zamanda protein yan zincirlerinde bulunan sistein, histidin ve lizin aminoasitlerinin lipid peroksidasyon ürünleri ile, indirgeyici şekerler tarafından oluşturulan karbonil türevleri ve proteinlerin lizin rezidülerinin oksidasyon ürünleri ile sekonder reaksiyona uğramaları

sonucunda da proteinler üzerinde karbonil gruplar oluşabilir (168). Oksidatif stres sonucunda proteinlerden oluşan bu gruplar, hücre iskeletini oluşturan proteinlerde ve enzimlerde yapısal ve işlevsel değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler birçok hastalığın patogenezinin sorumludur.

Protein karbonil grupların ölçüm yöntemlerinin çoğu karbonil grupların 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyonu sonucu dinitrofenol oluşumuna dayalıdır. Son ürün spektrofotometrik, ELISA ve Western Blotting gibi yöntemlerle ölçülebilir. Protein karbonil gruplarının daha erken oluşumu ve daha stabil olmaları nedeniyle kullanımları lipid peroksidasyon ürünlerine göre daha avantajlıdır (168).

Oksidatif stresin nükleik asitler üzerine etkisi özellikle kanser gelişimi olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde görülmektedir. Diğer moleküllerdekine benzer şekilde DNA yapısındaki çift bağlara H atomu ekleyerek veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve timin yapısındaki metil gruplarından H atomunu çıkartarak oksidatif değişiklikler oluşturmaktadır (169). Sonuçta oluşan timin kaynaklı radikaller indirgenir ve hidroksihidroperoksit, timin glikol, 5-hidroksimetilurasil, 5-formilurasil ve 5 -hidroksi 5-metilhidantoin gibi oksidasyon ürünlerine dönüşürler. Değişikliğe uğrayan DNA'nın oksidatif hasarı sonucunda 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) oluşur. 8-OHdG, DNA oksidatif hasarı sonucunda oluşan ve en fazla bilinen bileşiktir. 8-OHdG formunda oksidatif değişikliğe uğramış DNA, DNA hasarının düzeyinin ifade edilmesinde kullanılır (170).

2.6 Kardiyovasküler Hastalıklar, Kalp Yetmezliği ve Oksidatif Stres

20. yüzyılın başında yüksek metabolizmaya sahip hayvanların kısa ömürlü olmalarından dolayı "Yaşam hızı hipotezi" kavramı ortaya atılmıştır. 1956 yılında Denham Harman, zamanla hücrelerde endojen oksijen radikalleri üretildiğinden, DNA, protein, lipidler ve hücrenin diğer bileşenlerini hedefleyen kümülatif hücre hasarına yol açan bir 'serbest radikal teori' önerisinde bulundu (171). Birçok kardiyovasküler hastalığın yaşlı popülasyonda görülme insidansının artması nedeniyle serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stres ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki araştırmacılar tarafından aydınlatılmaya çalışılmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sol ventrikül remodellingi ve yetmezliğinin ilerlemesinin, konjestif kalp yetmezliği ile karakterize sol ventrikül sistolik disfonksiyonunun nedenleri arasında oksidatif stresin de olduğunu göstermiştir. Bu yüzden KY'nin durumunu değerlendirmek için oksidatif stres belirteçleri ölçülmektedir (19-23).

İzole mitokondriyal deneylerden elde edilen verilerde solunum zinciri reaksiyonları sırasında sızan oksijenin % 2-3'lük kısmının mitokondri matriksinde bulunan mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) enzimi tarafından H_2O_2 'ye dönüştürüldüğü izlenmiştir (172). Mn-SOD eksikliği olan hayvanlarda ölümcül perinatal kardiyomiyopati gelişmesi ve kardiyak özgül Mn-SOD gen delesyonu olanlarda ilerleyici konjestif kalp yetmezliği görülmesi mitokondriyal oksijen sızıntısının ortamdan uzaklaştırılmasının önemini ortaya koymuştur (173, 174). Diğer taraftan Mn-SOD enziminin aynı zamanda H_2O_2 üretimi yapması, diğer ROT bileşenlerinin oluşması açısından önemlidir. Oluşan H_2O_2 , mitokondriyal H_2O_2 süpürücü görevi olan peroksiredoksin-3 tarafından uzaklaştırılmaktadır. Deneysel olarak miyokard infarktüsü oluşturulan farelerde aşırı ekprese edilen peroksiredoksin-3'ün kalp yetmezliği gelişimi açısından koruyucu olduğu izlenmiştir (175).

NADPH oksidaz enzimi elektron kaynağı olarak NADPH kullanıp oksijenin süperokside indirgenmesini sağlayan birçok izoformu bulunan çoklu subunitlerden oluşan bir enzimdir. Enzim hücre membranına bağlı ya da sitoplazmik yerleşim gösterir. Temelde görevi nötrofil ve makrofajlarda mikroorganizmalara karşı savunma sistemi oluşturmaktır. Enzimin genetik defektinde “kronik granulomatöz hastalık” isimli klinik sendrom görülmektedir. Vasküler endotel hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve kardiyomiyositler gibi fagositik olmayan hücrelerde de NADPH oksidaz enziminin izoformları bulunmaktadır (176). Yapılan hayvan deneylerinde NADPH oksidaz izoformlarının kardiyak fibröziste, miyokard infarktüs sonrası kardiyak yeniden biçimlenmede ve anjiotensin II bağımlı kardiyak hipertrofide rolü olduğu gösterilmiştir (177-179). NADPH oksidaz izoformlarının damarsal yapılarla yapılan çalışmalar noktasında ateroskleroz gelişimi, aort anevrizması ve arteriyel yaralanmaya karşı gelişen yanıtla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (180-184).

Ksantin oksidaz (KO) ve ksantin dehidrogenaz enzimi aynı enzimin formlarıdır. KO enziminin özellikle kapiller damar endotelinde yüksek miktarda salınımı tespit edilmiştir (185). Enzimin her iki formu da hipoksantini ksantine, ksantini ürik aside çevirmekte, ama sadece oksidaz formu süperoksit ve hidrojen peroksit oluşturmaktadır (186). Enzimin normal şartlarda mevcut formu ksantin dehidrogenaz formudur. Hipoksik ve diğer stres nedenlerine bağlı oluşan koşullarda oksidaz formu baskın hale gelmektedir. KO çeşitli organlarda iskemik dokunun reperfüzyonu sonrasında artış gösteren ROT'larla ilişkilendirilmiştir (187-189). Bu oksidan etkilere rağmen ksantin dehidrogenaz enzim eksikliği olan farelerin genetik kanıt bulunamayan bu durumla 6 hafta içerisinde renal dizplaziden öldükleri izlenmiştir (190).

Başka bir çalışmada KO enziminin allopurinol gibi farmakolojik olarak, tungstenden zengin ve molibdenden eksik diyetle inhibisyona uğratıldığı hayvan deneylerinde aterosklerozun azaldığı tespit edilmiştir (191, 192).

NOS enzimi L-arginin'den L-sitrülin oluşumu sırasında NO (nitrik oksit) üretimini katalizleyen bir enzimdir. Nöronal, endotelial ve indüklenebilir olmak üzere üç tür NOS enzim formu bulunmaktadır (193). Nöronal ve endotelial NOS (eNOS) hücre içinde yapısal olarak bulunan enzimlerdir. İndüklenebilir NOS (iNOS) proinflamatuvar mediyatörler tarafından uyarı geldiği zaman ortaya çıkar. NOS enziminin ROT'larla ilişkisi daha çok iNOS üzerinden olmaktadır. Aktive edilmiş NOS homodimerik yapıya sahiptir. Her monomerinde redüktaz ve oksidaz aktiviteye sahip alanlar bulunmaktadır. NO üretiminde eNOS üzerinde elektronlar NADPH kofaktörü üzerinden, flavin diadenin nükleotide, flavin adenin mononükleotide ve hem grubuna aktarılır. Bu elektron transferinde L-arginin, tetrahidrobiyopterin (BH₄) kofaktörü varlığında NO ve L-sitrüline okside olur. Eğer eNOS belirli koşullar altında kofaktör ve substratından ayrılırsa NO üretimi yerine süperoksit üretimi söz konusu olur (194). Ayrılmış NOS enzimi ROT için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Kolesterol ile beslenen hayvanlarda vasküler BH₄ miktarına bağlı olarak eNOS ayrılması görülmektedir (195). Diyabetli veya aterosklerozlu insanlardan elde edilen arter segmentleri eNOS ayrılması sergilediğinden, bu bulguların klinik olarak anlamlı olduğu görülmüştür (196, 197). Bununla birlikte ayrılmış NOS'un vasküler süperoksit üretimi, BH₄ düzeylerini artıran 5-MTHF (5 metil tetrahidro folat) ile tersine çevrilerek azaltılmıştır (198). Buna rağmen uzun süreli folik asit ve B₁₂ vitamini takviyesi vasküler değişiklikler üzerine etkili olmamıştır (199). Kalpte, eNOS sadece endotelde değil kardiyak miyositlerden de eksprese edilmektedir. Genel olarak kanıtlar kardiyak eNOS koruyucu olduğunu göstermektedir. Genetik olarak eNOS geni delesyonlu farelerde miyokard infarktüsü ile birlikte uzun dönemde mortalitenin arttığı ve sol ventrikül fonksiyonlarının zayıfladığı görülmüştür (200). Aort daralması sonucunda basınç yüklenmesine bağlı durumda, eNOS defekti olan farelerde, daha şiddetli sol ventrikül hipertrofisi, sol ventrikül işlev bozukluğu ve miyokardiyal fibroz gösterilmiştir (201). Diğer iki izoform olan iNOS ve nNOS enzimlerinde de ayrışmanın etkisi araştırılmış ama net olarak ortaya koyulamamıştır. Bazı çalışmalar APO-E defekti olan farelerde iNOS defektinin de olmasının aterosklerotik plak oluşumunu belirgin olarak azalttığı görülmüştür (202-204). Deneyisel bir miyokard infarktüs modelinde, iNOS eksikliği olan farelerde, vahşi tipli farelere kıyasla artmış kontraktilite ve azalmış mortalite gösterilmiştir (205). Bir aortik daralma modelinde ise, iNOS eksikliği olan fareler, vahşi tipli farelerden çok daha az kardiyak

hipertrofi, dilatasyon, fibröz ve sol ventrikül disfonksiyonu göstermiştir (206). Tersine, artmış miyokard iNOS salınımı olan farelerde, kardiyak fibrozun, kardiyomiyosit ölümünün, kardiyak hipertrofinin ve sol ventrikül dilatasyonunun arttığı izlenmiştir. Bu farelerde aşırı kalp yetmeliği gelişmiş, fareler atrioventriküler blok ve asistoliden aniden ölmüşlerdir (207). Bu durumun olası mekanizması, gerekli NO için eNOS'un ihtiyacı olan BH₄'ün iNOS tarafından oksidasyona uğraması olarak düşünülmüştür (208). nNOS eksikliği olan farelerde de kardiyak olarak şiddetli sol ventrikül remodellingi ve vahşi tip farelere kıyasla mortalite hızlarında artma görülmüştür (209, 210).

Miyeloperoksidaz (MPO) hem peroksidaz enzim ailesinin bir üyesidir. MPO nötrofil ve makrofajlardan salgılanarak lipid ve protein oksidasyonuna neden olan ROT'lar üretir (211, 212). MPO hidrojen peroksitten hipokloröz asit (HOCl) oluşumunu katalizler. MPO'nun ateroskleroz gelişiminde oksidatif etki gösterdiğine dair önemli kanıtlar vardır (213). MPO içeren makrofajların lipoproteinlerle beraber bulunduğu aterosklerotik lezyonlarda HOCl'nin oksidatif etkisi gösterilmiştir (214). MPO oksidasyonu sonucu stabil olan aterosklerotik plak zayıflayarak rüptüre olabilir. HOCl'nin matriks metalloproteinazlarını aktive etmesi ve arter duvarındaki lipidleri oksidasyona uğratması sonucu aterosklerotik plağın stabilizasyonu bozulabilmektedir (213, 215, 216). Fare deneyinde ise aterosklerotik lezyonlarda MPO birikimi görülmemiştir. Aksine MPO eksikliği olan farelerde ateroskleroz gelişiminin arttığı izlenmiştir (217). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada insan MPO'su ile yapılan fare deneyinde MPO'nun ateroskleroz gelişimine katkıda bulunduğu görüşü desteklenmiştir (218, 219). MPO aynı zamanda HDL (yüksek dansiteli lipoprotein) yapısındaki APO A1 (Apolipoprotein A1)'e bağlanarak oksidasyonuna neden olur. İnaktive olan APO A1 lesitin:kolesterol açıl transferaz enzimini aktive edemez ve HDL olgunlaşmamış olarak kalmaktadır (220). Dolayısıyla HDL işlevselliğini kaybetmekte ve kardiyovasküler hastalık gelişim riski artmaktadır.

Kardiyovasküler hastalıklarda ROT'ların etkilerinin daha net anlaşılması için etkileri görüntülemeye çalışılmış ve floresans problemleri ve elektron spin rezonans problemleri bu etkileri göstermek için kullanılmıştır (221, 222). Ama ROT'ların çok reaktif olması ve tekniklerin yetersiz olması insan ve hayvan çalışmalarını sınırlandırmıştır (223).

ROT'ların klinik olarak kardiyovasküler hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanımı sınırlı kalmıştır. ROT'ların bu süreçte olgunlaşmasını destekleyecek yeterli çalışma yoktur. Aynı zamanda ROT kaynaklı ürünlerin klinik olarak kardiyovasküler biyobelirteç olarak

kullanımını öneren az sayıda literatür bulunmaktadır. Örnek olarak koroner hastalarında azalmış glutatyon peroksidaz-1 enzimi, 5 yıllık kardiyovasküler olay görülme insidansında artışı öngörmektedir (224). İyi bilinen bir antioksidan olan askorbik asit düzeylerinin azalması kararsız bir koroner durumun varlığını gösterebilir (225). Akut miyokard infarktüsli hastalarda 8 hidroksil-2'-deoksiguanozinin üriner düzeyleri, daha sonraki kardiyak olayları öngörmek için kullanılmıştır ve dilate kardiyomiyopati hastalarında, kontrol vakalarına kıyasla, 8 hidroksil-2'-deoksiguanozin serum düzeyleri belirgin şekilde yükselmiştir (226, 227).

Zayıf kalp performansı, hayati organların yetersiz kanlanmasına neden olur. Uzun yıllar boyunca yapılan çalışmalar, kalp yetmezliğinin sadece miyokardın bazı akut olaylardan (infarktüs, genetik anormallik, hipertansiyona bağlı basıncın aşırı yüklenmesi gibi) ibaret olmadığını, aynı zamanda kardiyak hasarla giden uyumsuz bir iyileşme sürecini de içerdiğini göstermektedir. KY'nin gelişimine neden olan tüm bu olaylar için oksidatif stresle ilişkilerini gösteren kanıtlar bulunmaktadır (228, 229). ROT'ların iskemi reperfüzyon hasarı, antrasiklin kardiyak toksisitesi, endojen kardiyak antioksidanların azaltılması, kardiyak yeniden şekillenmenin olduğu patolojik durumlarda rol oynadığı açıktır (230-237). Örnek olarak glutatyon peroksidaz enziminin aşırı salgılandığı farelerin sol ventrikül genişlemesinden ve fonksiyon bozukluğundan, miyokard infarktüsü sonrası ölümden korunduğu görülmüştür (238).

Hayvan deneylerinde kullanılan antioksidan tedavilerin miyosit hasarını sınırlandırdığı, reperfüzyon sonrası kardiyak fonksiyonu iyileştirdiği, kardiyak yeniden şekillenmeyi ve kardiyomiyopatiyi hafiflettiği gözlenmiştir (239-247). Kalp yetmezliği olan hastalarda oksidatif stres artışını destekleyen çeşitli biyobelirteçler bulunmaktadır. Okside LDL veya MDA modifiye LDL, F2-isoprostan, MPO, bilirübinin okside metaboliti olan biopirin ve 8 hidroksil-2'-deoksiguanozin belirteçlerinin KY'de artış gösterdiği izlenmiştir (19, 21, 226, 248). Miyokarddaki NADPH oksidaz aktivitesi KY'de atmaktadır. Kalpteki elektroparamanyetik rezonans çalışmasında spin tuzaklamaları doğrudan ve belirgin olarak süperoksit artışını göstermektedir (249). Serum ürik asit seviyeleri KY'nin fonksiyonel bir sonucu olarak artar ve kronik kalp yetmezliği hastalarının sağkalımlarını bağımsız olarak öngördürmektedir (250). Ürik asit seviyelerinin kısmen KO enzim düzeylerini yansıttığı düşünülmektedir. KO artışı KY insidansını tahmin edebilecek bir belirteç olarak düşünülebilir (251). Bu çalışmaya benzer şekilde başka bir çalışmada, miyokarddaki ksantin oksidaz

aktivitesi normal sol ventrikül fonksiyonlu kronik mitral yetersizliği olan hastalarda artmış ve miyofibriler dejenerasyon ve kontraktıl işlev bozukluğuna katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (252).

KO enzim aktivitesinin KY'de artması KO enzimi ilgili ek çalışmaların yapılmasının yolunu açmıştır. Bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinolün intrakoroner infüzyonu, kalp yetmezliği hastalarında miyokard fonksiyonlarını arttırdığı gözlenmiştir ve sistemik allopurinol kullanımının, serum ürik asit seviyelerinden bağımsız olarak, kalp yetmezliği tanısı konmuş hastalarda oksidatif stres belirteçlerini azalttığı ve endotel fonksiyonunu iyileştirdiği tespit edilmiştir (253-255). Bu çalışmalar KO'nun kalp yetmezliğinin bazı fizyolojik unsurlarına etkisi olduğunu göstermiştir. KO'nun endotel disfonksiyon ve miyokart verimliliğini düşürücü etkisi yine bu çalışmalarda görülen patolojik etkilere. Ama KO seviyeleri ile iyileşen hastaların durumu arasındaki ilişki net olarak ortaya konulamamıştır. Bu soruna açıklık getirmek için oxipürinol tedavisi uygulanan 405 kalp yetmezliği hastasının dahil edildiği randomize çok merkezli bir çalışma yapılmış. Allopürinola benzer etkiye sahip bu ilacın KY'nin morbiditesi, mortalitesi ve hasta yaşam kalitesi üzerine etkisi olmadığı gözlenmiştir (256). KO'nun KY'nin bazı fizyolojik yönlerine etkisi görülürken, KY hastalarının klinik sonuçlarına katkısı bulunamamıştır.

Genel olarak, oksidatif stres ile ROT'ları kardiyovasküler hastalıkların fizyolojisi ve patofizyolojisine bağlayan önemli veriler vardır. Muhtemelen, ROT'ların önemli ve çeşitli fizyolojik rollere sahip olması nedeniyle, basit antioksidan stratejilerle kardiyovasküler hastalıkların belirtilerini iyileştirmeye yönelik başlangıç girişimleri yararlı olmamıştır.

2.7 Kalp Yetmezliği Biyobelirteçleri, Oksidatif ve Antioksidan Sistem Belirteçlerinin KY'deki Yeri

Natriüretik peptitlerin kardiyovasküler sistem üzerine faydalı etkileri bilinmektedir: diüretik, natriüretik, vazodilatasyon, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin baskılanması ve sempatik tonusun azaltılması gibi; ayrıca anti-fibrotik ve anti-hipertrofik etkilere sahiptirler (257-260). BNP kalp yetmezliğinin tanısında, tedavi izleminde ve hastaların klinik prognostik takibinde önemli bir yere sahiptir. BNP'nin birçok yararlı etkisinin olmasının aksine BNP düzeylerinin artması kalp yetmezliği hastalarında genellikle prognozun kötüye doğru ilerlediğini ifade etmektedir. Düşük seviyelerin hastalar açısından daha iyi bir sağkalımla sonuçlandığı kabul edilmektedir. Çalışmalara göre KY göreceli olarak natriüretik peptidlerin

yetersizliği olarak da görülebilir. Tüm KY'lilerde natriüretik peptidlerin artışına rağmen işlevlerini yerine getiremediği gözlenmiştir (261, 262). Bazı durumlarda yüksek BNP düzeylerine sahip hastaların prognozunun iyi olduğu, düşük BNP düzeylerine sahip olanların ise kötü bir klinik davranış gösterdiği izlenmiştir (263, 264). BNP'nin prognostik süreçteki etkisinin yönünün belirlenmesi açısından çok yüksek BNP değerlerine sahip hastaların olduğu çalışmada klinik gidişatın ve sağ kalımın farklı prognostik belirteçlerden de etkilendiği ortaya konulmuştur (265). Bu çalışmada yüksek BNP düzeylerine sahip ama klinik evreleri NYHA'ya göre düşük olan hastaların 1 yıllık ölüm risklerinin azaldığı izlenmiştir (265). Hatta aynı çalışmada 400 pg/mL den düşük BNP düzeyi olan ve 1 yıl içerisinde ölen hastaların natriüretik sisteminin aktive olmadığı görülmüş ve yaşlı olmalarına rağmen BNP düzeyleri düşük seyretmiştir (265).

ADM düzeyini kanda kararlı bir şekilde yansıtan ve ADM ölçümü yerine kullanımı daha avantajlı olan MR-ProADM peptidi de BNP gibi kardiyovasküler olayları öngörme, prognozu tahmin etme ve mortalite riskini belirlemek açısından sol yıllarda odak noktası haline gelmiştir. Plazma ADM konsantrasyonları miyokard infarktüsüyle birlikte artmış ve sonrasında gelişen kalp yetmezliğinin şiddeti ile korele olduğu izlenmiştir (111, 266). Kronik kalp yetmezliği olan hastalarda MR-proADM'nin mortalitenin bağımsız bir öngördürücüsü olduğu ve yerleşmiş biyobelirteçlerin ötesinde ilave prognostik bilgi sağladığı gösterilmiştir (24, 267, 268). Artmış MR-proADM konsantrasyonları akut dispneli ve kalp yetmezliği bulunan hastalarda kötüleşen klinik durumlarla ilişkili bulunmuştur (18). MR-proADM hastalarda miyokard infarktüsü sonrası komplikasyon gelişimi ve kronik kalp hastalıklarının olumsuz sonuçları açısından güçlü bir öngördürücü olmasına rağmen, özellikle kalp yetmezlikli hastaların uzun dönem takiplerinde gelişen olaylara yönelik daha fazla incelenme gereksinimi duymaktadır. Daha önce akut koroner hastalık öyküsü olan kronik kalp hastalarının başlangıç MR-proADM düzeylerinin belirlenmesi risk faktörlerinin yakından takip edilmesi ve kronik kardiyak komplikasyonların tespiti açısından yararlı olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bu süreç kalp hastalarının tedavilerinin takibinde ve kanıta dayalı tedavilerinde erken önlemler alınmasını sağlayabilir. Hastalardaki MR-proADM düzeylerindeki değişikliklerin izlenmesi ve değerlendirilmesinin KY gelişim riskinin belirlenmesinde natriüretik peptidlerden ziyade faydalı olabileceği belirtilmiştir (269).

Geçmişte akut koroner sendromların tanısında, miyogloblin, kreatin kinaz (CK) ve CK-MB izoformu da dahil olmak üzere çoklu biyolojik belirteçler kullanılmış ancak miyokardiyal

nekrozdan sonra gecikmeli olarak salınmaları ve/veya özgüllük eksiklikleri klinik pratik kullanımlarını sınırlandırmış ve teşhis performanslarını düşürmüştür. Sonrasında halen erken miyokard infarktüsü tanısında altın standart olan troponin kullanılmaya başlanmıştır. Ancak troponin tanıya yardımcı olacak kan düzeyine göğüs ağrısı başlangıcından 3-6 saat sonra ulaşmıştır. Bu dezavantaj yüksek duyarlılıklı troponin ölçümüne başlanmasıyla kısmen düzeltilebilmiştir. Fakat akut koroner sendromun tanısız özgüllüğünde zayıflama olmuştur. Örnek olarak akut kalp yetmezliği, pulmoner emboli, miyokardit ve ciddi sepsiste miyokart nekrozu görülmekte ve troponin düzeyleri artmaktadır (270). Akut koroner sendromun aksine, KY yönetiminde en önemli konu akut KY tanısından ziyade kronik KY'li hastaların prognostik değerlendirmesidir. BNP ve NT-proBNP'nin, KY'de oldukça özgül oldukları gösterilmiş ve dispne veya şüpheli KY için acil servise sevk edilen hastaların yönetimi büyük ölçüde kolaylaştırılmıştır (271-275).

KY'nin yönetiminde risk sınıflandırması önemlidir. Yüksek riskli hastalara implante edilebilir cihaz uygulanması ve/veya kardiyak transplantasyon gibi invaziv girişimlerin yapılması sözkonusu olabilir. NYHA sınıflaması, sağ ve sol ventrikül fonksiyonları, BNP düzeyleri ve kardiyopulmoner egzersiz testlerinden elde edilen verilerin kronik kalp yetmezliği hastalarının klinik sonuçlarıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (273). Tüm bu testlere rağmen hastaların risk sınıflandırmasının daha da iyileştirilmesi gerekmektedir. Düşük risk sınıfına giren ama diğer tarafta prognozu kötü olabilen hastalar olabilmektedir. Ek olarak, kardiyopulmoner egzersiz testi, rutin uygulamada risk sınıflaması için nadiren kullanılan zaman alan bir yöntem olduğundan, bazı güçlü göstergeler hastalar için yetersiz kalabilmektedir. Sonuç olarak, hekimlerin, özellikle invaziv stratejiler için düşünülmesi gereken hastaları daha iyi seçebilmek için, kronik KY'deki terapotik seçeneklere karar vermesine yardımcı olabilecek araçlara ihtiyaç vardır. Bu nedenle, ek bilgi sağlayabilen yeni biyolojik belirteçler, hekimlerin kararlarına yardımcı olmak için klinik pratikte büyük ilgi görmektedir (7, 276). AVP salgısının yerine geçen kopeptin, kardiyovasküler hastalıklarda, özellikle akut koroner sendrom ve kronik KY'de büyük bir potansiyel ortaya koyan yeni bir biyobelirteçtir.

Oksidatif stres KY'yi de içeren kardiyovasküler hastalıkların patolojik gelişim sürecinde önemli bir yer tutmaktadır. Kronik KY'deki oksidatif stresin etkisinin dolaşımdaki nörohormonların artması, hemodinaminin bozulması, oksijen dağılımının azalması ve inflamasyon sonucu oluştuğuna inanılmaktadır (277). Diğer taraftan KY'de redoks dengesinin bozulması sonucu gerçekleşen hücresel bileşenlerin etkilenmesi kardiyak hasarı dahada

artırmaktadır. KY’de ölçümü yapılan bazı oksidatif stres ve antioksidan sistem belirteçlerin KY’nin etyopatolojisinin yanında, hastalık tanısı konulduktan sonraki klinik prognoz ile ilişki içerisinde olduğu gösterilmiştir. Seruloplazmin, alfa-2 glikoprotein sınıfına ait bir plazma proteindir. Kendisinin hem antioksidan hem de oksidan etkileri bulunmaktadır (278). Seruloplazmin akut faz reaktanı olarak görev yapan ve plazmada bakır taşınmasından sorumlu bir proteindir. Antioksidan etkisinden esas olarak ferroksohidraz I aktivitesine sahip olması sorumlu tutulmaktadır (279). Bu şekilde Fe^{+2} ’i Fe^{+3} ’e okside edilerek hidroksil radikali üretimi önlenmektedir. Aynı zamanda MPO enzimi inhibisyonu yapması da antioksidan özellikleri arasındadır. Oksidatif etki olarak amin oksidaz ve NO oksidaz aktiviteleri göstermektedir (280, 281). Kardiyovasküler hastalıkların seyrinde önemli vasküler etkilere sahip plazma NO biyoyararlanımını azalttığı gösterilmiştir. Ferroksohidraz I aktivitesi, reaktif oksijen ve azot türlerinin demir bağımlı oluşumunu önemli derecede azaltır ve kronik kalp yetmezliğindeki oksidatif hasara karşı koruma sağlamaktadır. Toplumda aterosklerotik risk belirlenmesi yapılan bir çalışmada asemptomatik bireylerde yüksek seruloplazmin düzeylerinin KY insidansı ile ilişkili olduğu görülmüştür (282). Yüksek seruloplazmin konsantrasyonunun KY ile olan ilişkisinin, NT-proBNP, yüksek duyarlılıklı troponin T ve yüksek duyarlılıklı CRP gibi KY gelişimi tahmininde rol oynadığı bilinen diğer biyolojik belirteçlerle benzer olduğu görülmüştür (283). Xu ve arkadaşlarının çalışmasındaki verilere göre; kronik KY’de seruloplazmin seviyeleri yükselmiştir (284). KY’de özellikle oluşan peroksinitrit seruloplazmin protein yapısında zarar vererek seruloplazminin ferroksohidraz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Ferroksohidraz I aktivitesi azalmış hastaların 2 yıl içerisinde mortalitelerinin anlamlı derecede arttığı izlenmiştir. Ama plazma seruloplazmin düzeylerinin kronik KY hastalarının mortalitesi ile ilişkisi çıkmamıştır (285).

MPO hem nötrofillerde hem de makrofajlarda bulunan oksidatif ürünlere neden olan bir enzimdir. Fizyolojik olarak rolü olmasının yanında hücrelerden dışarı kontrolsüz olarak salınması sonrasında özellikle hipokloröz asit başta olmak üzere çeşitli oksidan bileşiklerle doku hasarına neden olmaktadır. Hipokloröz asidin proteinlerdeki tirozin aminoasidi kalıntılarıyla reaksiyona girmesi sonucunda 3-klorotirozin oluşmaktadır. 3-klorotirozin MPO içeren hücreler için oksidan hasarın bir göstergesidir (286, 287). Dolayısıyla MPO hem inflamasyon hem de oksidatif stres göstergesi olarak ele alınmaktadır (288). Kalp hastalığının tüm evrelerinde MPO düzeylerinde yükselme saptanmış ve ortaya çıkan sıkıntılı kardiyak durumlarla ilişkilendirilmiştir (289-291). Çeşitli çalışmalardan elde edilen veriler, şiddetli KY’de polimorfonükleer nötrofil aktivasyonu ve MPO salınımı olduğunu göstermiştir (292,

293). Dahası, daha agresif hastalığı olan hastalarda daha yüksek MPO seviyeleri gözlemlenmiştir. Tang ve arkadaşlarının çalışmasında hem kronik KY klinik fenotipi hem de BNP konsantrasyonları ile MPO düzeyleri karşılaştırılmış ve kronik KY hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek MPO konsantrasyonu bulunmuştur (293). Ayrıca, KY'li hastaların plazmasındaki yükselmiş MPO gelecekteki kötü prognostik durumlar için öngördürücü olmuştur (288) . Bu nedenle, Kardiyovasküler Sağlık Araştırması kapsamında, 5-10 yıllık dönemde, KY gelişiminde artış olup olmayacaklarını izleyen sağlıklı yaşlı katılımcılarda MPO düzeyleri değerlendirilmiştir. Miyokard infarktüsü, yaş, cinsiyet, sistolik kan basıncı, sigara, LDL kolesterol, diyabet ve herhangi bir kardiyovasküler hastalık için düzeltme yapıldıktan sonra en yüksek MPO çeyreğinde (> 432 pmol / L) olanlar KY gelişme riski daha yüksek çıkmıştır. İlginç bir şekilde, bu ilişki, geleneksel kardiyovasküler hastalık risk faktörleri olmayan kişilerde daha güçlü izlenmiştir (277).

Hücrel makromoleküller arasında DNA, ROT'ların başlıca hedeflerinden biridir. Hidroksil radikali veya singlet oksijen, 2-deoksiguanozinin, C-8 konumunu hidroksillendirdiği zaman oksidatif DNA hasarının belirteci olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin üretilir (294-297). 8-OHdG şiddetli dilate kardiyomiyopati hastaların kalp dokularında immünohistokimyasal olarak tespit edildiğinden, KY'de ROS üretimini yansıtan özgül oksidatif yan ürünler ile ilgili olarak, 8-OHdG'nin iyi bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür (298, 299). Kobayashi ve arkadaşları, kronik KY hastalarında ve kontrollerde aort kökü ve koroner sinüste kandaki 8-OHdG'yi ölçmüş ve serum 8-OHdG'nin koroner sinüste aorta göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (300). Ayrıca üriner 8-OHdG'nin bu hastalarda semptomatik durum ve kardiyak disfonksiyon ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (300). İdrar 8-OHdG 'nin BNP'yle benzer şekilde sol ventrikül ejeksiyonu, pulmoner kapiller kama basıncı veya sol ventrikül diyastol sonu hacim indeksi ile anlamlı bir korelasyonu bulunmuştur. Bu nedenle üriner 8-OHdG, kısa süre önce Szczurek ve arkadaşları tarafından kronik KY hastalarında oksidatif stres durumunun yanı sıra KY şiddetini değerlendirmek için yararlı bir belirteç olarak klinik kullanımı önerilmiştir (300, 301). Üriner 8-OHdG'nin ölüm gibi kardiyak olaylarda BNP ile beraber bağımsız bir öngördürücü belirteç olduğu düşünülmüştür (302). Karvedilol ile yapılan tedavinin, oksidatif DNA hasarını azaltmak için etkili olabileceği belirtilmiştir (298). Karvedilol tedavisinden sonra idrarda 8-OHdG konsantrasyonunda belirgin azalmanın yanı sıra NYHA sınıfında, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda ve BNP konsantrasyonunda düzelme olduğu tespit edilmiştir (302).

Tioredoksin (Trx) çeşitli hücrelerde redoks dengesinin korunmasında önemli bir role sahiptir (303). Tioredoksin, tioredoksin redüktaz enzimi tarafından katalizlenen ve NADPH kullanılan reaksiyonla 2 adet tiol grubuna sahip olmaktadır. İndirgenmiş haldeki tioredoksin protein yapısındaki disülfid bağlarıyla etkileşime girerek çeşitli uyaranlar sırasında protein doğal yapısının korunmasına yardımcı olmaktadır. Sistein kalıntılarını değiştirme kabiliyeti nedeniyle, Trx1 geniş bir hücre fonksiyon göstermektedir (303). Böylece, Trx1, peroksiredoksini düşürerek oksidatif stresi azaltır ve bu da H_2O_2 'yi azaltır. Ek olarak Trx1, transkripsiyon faktörlerinin ve hücre içi sinyal moleküllerinin aktivitelerini ve subselüler lokalizasyonunu da düzenlemektedir (304). Plazma Trx1'in kronik KY biyolojik belirteci olarak yararlı olabileceği hipotezini destekleyen ilk kanıt 2004 yılında Jekell ve arkadaşları tarafından kronik KY hastaları ile kontroller arasındaki başlangıç plazma Trx düzeylerini karşılaştıran çalışmada elde edildi (305). Bu çalışmada kronik KY hastalarının kontrol grubuna kıyasla Trx plazma konsantrasyonları anlamlı derecede yüksek izlenmiş. Trx düzeyleri aynı zamanda NYHA sınıflamasına göre belirlenen hastalığın şiddeti ve oksidatif stres derecesi ile korele bulunmuş (305). Trx'in KY prognozundaki yerini göstermek için yapılan bir çalışmada bu bulgular tekrar teyit edilmiş ve en yüksek Trx düzeylerine sahip hastaların 1250 gün boyunca kardiyak olarak olumsuz klinikle karşılaşma oranları düşük bir sağkalıma sahip oldukları izlenmiş (306). Dolayısıyla Trx'in KY'ne bağlı ortaya çıkacak kardiyak olayların bağımsız bir öngördürücüsü olduğu ortaya çıkmıştır (306). Buna ek olarak, plazma Trx1 düzeyi yükselmiş hastalarda renal tübüler hasar belirteç düzeyleri de daha yüksek ölçülmüş. Araştırmacılar kronik KY hastalarında Trx1 sekresyonunun kesin mekanizmalarını doğrulayamamış olmalarına rağmen, ROC (Alıcı işlem karakteristikleri, Receiver Operating Characteristic) eğrisi analizine göre, gelecekteki kardiyak olaylar için Trx'in BNP'den daha iyi özelliklere sahip olduğu görülmüştür (306).

Yapılan araştırmalarda görüldüğü üzere oksidatif stres KY'nin etyopatogenezinde önemli bir yere sahiptir. Hatta oksidatif stres ve antioksidan sistem belirteçleri KY'nin derecesiyle ilişkili olarak değişkenlikler gösterebilmektedir. Lipid oksidasyon ürünlerinden olan MDA düzeyleri de KY'de artmaktadır (307). MDA, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile de ters orantılı bir ilişki içerisinde (307, 308). MDA konsantrasyonlarındaki azalmanın KY hastalarının klinik olarak iyileşmesiyle korelasyon gösterdiği bulunmuştur (307, 308). Tedavi altındaki konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda tedaviye yanıtı iyi olanlarda MDA düzeylerinin tedaviye yanıt vermeyen hastalara oranla azaldığı görülmüştür (309).

KY'deki oksidan hasar doğrudan ROT'lar yardımıyla oluşabildiği gibi antioksidan sistemin yetersiz olduğu durumlarda patolojik sürece katkıda bulunmaktadır (310). MDA'nın kontrol vakalarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu konjestif KY çalışmasında, KY hastalarının lipofilik antioksidan parametrelerinin anlamlı olarak düşük olduğu gösterilmiştir (307). KY derecesine göre antioksidan defans sisteminin yanıtları da değişebilmektedir. NYHA'ye göre yapılan KY sınıflamasına göre artan evrelerde glutatyon peroksidaz enziminin anlamlı olarak azaldığı ve lipid peroksit düzeylerinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (308). Antioksidan enzimlerin azalan aktivitesi genellikle KY'deki ROT konsantrasyonlarının yükselmesine tepki olarak ortaya çıkar. Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve antioksidan kapasite arasındaki dengesizlik olarak tanımlansa da, kronik KY hastalarında antioksidan savunma mekanizmaları ile ilgili veriler yetersiz kalabilmektedir. KY hastalarındaki SOD enzimi aktivitesi çalışmalara göre farklılık göstermektedir. KY'de oksidatif stres ve antioksidan sistemin morbidite ve mortalite tahmin edici etkisini araştıran bir çalışmada plazma SOD aktivitesi yüksek olarak izlenmiş (311). Kronik KY'li hastalarda vasküler oksidatif stres ve endotel hasarını inceleyen başka bir çalışmada ise plazma SOD aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük izlenmiştir (312). Plazma SOD aktivitesinin düşük ölçüldüğü aynı çalışmada plazma KO enzim aktivitesi anlamlı olarak kronik KY hastalarında kontrol grubuna göre yüksek ölçülmüştür (312).

2.7.1 Malondialdehit (MDA)

MDA lipid peroksidasyonun son ürünü olarak belirteç görevi görmesinin yanında aynı zamanda diğer lipid yapılara ve hücre membran bileşeklerine zarar vermektedir. Oksidatif stresin patogenezinde yer aldığı kardiyovasküler hastalıklarda artışı görülmekte ve tedavi uygulanan hastalarda azalmış olduğu tespit edilmiştir (313). Yapılan bir çalışmada MDA'nın KY'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiş olduğu görülmüş. Aynı çalışmada MDA düzeylerinin KY'nin NYHA'ya göre fonksiyonel sınıflama derecesiyle anlamlı korelasyon göstermediği de ortaya konulmuş (314). Bazı çalışmalarda ise bu durumun aksine MDA fonksiyonel sınıflarla korelasyon göstermiştir (21, 308). Bunlarla birlikte MDA'nın iskemik kökenli KY veya diğer nedenlere bağlı gelişen KY'de artmış olduğu gözlenmiştir (308, 315).

2.7.2 Ksantin oksidaz

KO, ksantin oksido redüktaz grubu enzimlerindendir. Memelilerde karaciğer ve bağırsak dokularında yüksek miktarda bulunmaktadır (316). Ksantin oksidaz pürin yıkımının son basamakları olan hipoksantin ve ksantine ve ksantin de ürik aside dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Enzim vücutta en çok karaciğer hücresi, endotel hücreler ve meme epitelyum hücresinde bulunmaktadır (317, 318). Ksantin oksidaz tepkimesi oksijen bağımlı bir tepkime olup iskemi durumunda süperoksit ve hidrojen peroksit gibi oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. KO enziminin süperoksit üretimine katkıda bulunmasının yanında aktivite sonucu üretilen ürik asidin antioksidan özellikleri bulunmaktadır. Ürik asidin özellikle lipid peroksidasyonu ve hidroksil radikali üzerine koruyucu etkileri bulunmaktadır. Ürik asit artışı kardiyovasküler hastalıklarda bağımsız risk faktörü belirteci olarak da görev almaktadır (319). Bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinolün intrakoronar infüzyonu, kalp yetmezliği hastalarında miyokard fonksiyonlarını arttırdığı gözlenmiştir ve sistemik allopurinol kullanımının, serum ürik asit seviyelerinden bağımsız olarak, kalp yetmezliği tanısı konmuş hastalarda oksidatif stres belirteçlerini azalttığı ve endotel fonksiyonunu iyileştirdiği tespit edilmiştir (253-255). KO endotel hücre yüzeyinde glukozaminoglikanlara bağlı halde bulunmaktadır (320, 321). Heparinin bolus şeklinde infüzyonu sonrası KO enzimi bağlandığı yerden hızlıca plazmaya salınmaktadır. Yapılan çalışmalarda heparin intravasküler verilmesinden 5 dakika sonra plazma KO aktivitesinde maksimum artış görülmüştür (312).

Bazı durumlarda süperoksit üretimi sekonder olarak artabilir. İskemi-reperfüzyon hasarında ortaya çıkan bu durumda serbest radikallerin esas kaynağını ksantin dehidrogenaz enzimi oluşturmaktadır. Enzim hipoksi esnasında hızlıca KO'ya dönüşür ksantin dehidrogenazın NADH'tan elde ettiği elektronları direkt oksijene transfer ederek süperoksit üretimine katkıda bulunur.

2.7.3 Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD (EC 1.15.1.1), reaktif süperoksit radikalinin oksijene dismutasyonunu sağlayan ve daha az reaktif bir molekül olan H_2O_2 oluşumuna neden olan antioksidan bir enzimdir. H_2O_2 de katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerce ortadan kaldırılmaktadır. SOD ile $O_2^{\cdot-}$ temizlenmesi, oksidatif strese karşı savunmada ilk basamaktır. Çünkü $O_2^{\cdot-}$ 'nin radikal zincir reaksiyonlarının bir başlatıcısı olduğu bilinmektedir (322). İnsanlarda SOD'un sitozolik formu (SOD 1) (Cu^+-Zn^{+2} SOD), mitokondriyal formu (SOD 2) (Mn^{+2} SOD) ve hücre dışı

formu (SOD 3) (EC-SOD) olmak üzere üç izoenzimi mevcuttur (323). Ayrıca yapısında demir içeren süperoksit dismutaz (Fe-SOD) enzimi de bulunmaktadır. Fe-SOD'un hayvan dokularında varlığı gösterilememiştir, ama çoğu bakteride ve yüksek düzey bitkilerde bulunduğu bildirilmiştir (146). Hücre dışı SOD enzimi bakır ve çinko içeren bir glikoproteindir. Bu SOD formu heparin ve heparan sülfat gibi belirli glikozaminoglikanlara karşı yüksek bir afiniteye sahiptir ve salınımı oksidatif uyaranlarla değil sitokinlerce düzenlenmektedir (322). Hücre dışı SOD, dokuların interstisyel aralıklarında ve ekstraselüler sıvılarda bulunmaktadır. Plazma, lenf ve sinoviyal sıvıdaki SOD aktivitesinin büyük çoğunluğundan bu izoform sorumludur (324, 325).

KY'de SOD enzim aktivitesi artış gösterebilmektedir. KY'nin fonksiyonel sınıflaması olan NYHA sınıflamasına göre bakılan SOD aktivitelerinde 1'den 4'e kadar olan sınıflar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Ancak kontrol grubuna göre SOD aktivitelerinin anlamlı olarak arttığı izlenmiştir (311). Plazmadaki çözünebilen SOD enzimi öncesinde hücre membranındaki glikoprotein yapılara bağlanmaktadır. Landmesser ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kronik KY hastalarında heparin infüzyonu SOD enziminin plazma düzeylerini artırmaktadır. Yine bu çalışmada SOD enzim aktivitesi artmasına rağmen toplam enzim miktarındaki değişikliğin düşük olduğu ifade edilmiştir (312).

2.7.4 Katalaz (KAT)

KAT (EC 1.11.1.6), tetramerik yapıda ve her bir alt bileşeninde bir hem grubu içeren, yaklaşık 240 kDa molekül ağırlığına sahip bir hemoproteindir. KAT, H_2O_2 'yi su ve O_2 'ye çevirmektedir. KAT, hücrede peroksizomlarda bulunmaktadır. Ayrıca, hücrenin sitozolik ve mikrozomal bölümlerinde de daha düşük seviyelerde KAT bulunabilmektedir. KAT'nin en çok aktif olduğu dokular, böbrek ve karaciğer gibi yüksek peroksizom içeriğine sahip dokulardır. İmmün sistem hücrelerinde KAT, hücreleri kendi solunumsal patlama reaksiyonlarında oluşan ROT'lere karşı korumaktadır (326). KAT aktivitesinin miyokard infarktüsü ve KY vakalarında azaldığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (327, 328). KAT aktivitesinin NYHA sınıflamasına göre evrelenen hastalarda evreler arttıkça düzeylerinin azaldığı izlenmiştir. Ama evrelerin ilerlemesiyle KAT'ın ilişkisi anlamlı bulunmamıştır (328).

2.7.5 Glutasyon Peroksidaz (GSH-PO)

Selenyum içeren peroksidazlar grubundan olan GSH-PO (EC 1.11.1.19), yaklaşık 80 kDa moleküler ağırlığında, alt birimleri enzim aktivitesi için gerekli olan tek bir selenosistein bakiyesi içeren bir enzimdir. Hücrelerde esas olarak sitozol ve mitokondride yer almaktadır ve esas görevi peroksizomlar dışında oluşan H_2O_2 üretimini ortadan kaldırmaktır. GSH-PO, GSH kullanarak, reaktif sülfidril gruplarıyla H_2O_2 'yi suya ve lipid hidroperoksitleri de toksik olmayan alkollere dönüştürmekte ve memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korumaktadır. Bu reaksiyonlar sırasında redükte glutasyon (GSH) molekülleri, tek bir molekül olan glutasyon disülfide (GS-SG) dönüşmektedirler. GSH metabolizması en önemli antioksidan savunma mekanizmalarından biridir (322, 329). GSH-PO'nin KY ile ilgili çalışmalarında farklı değişiklikler gösterdiği izlenmiştir. Sağ ve sol ventrikülde ayrı ayrı GSH-PO gen ekspresyonu üzerine yapılan çalışmada GSH-PO gen aktivitesinin her iki ventrikülde de KY tanısı olmayanlara göre anlamlı arttığı izlenmiştir (330). Başka bir çalışmada ise miyokard dokusunda GSH-PO aktivitesinin KY tanılı olan grupta kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir (249).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gönüllü Seçimi ve Hastaların Gruplandırılması

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 25 Temmuz 2016 tarih ve 13-599-16 sayılı kararıyla uygun görülmüştür (EK-1). Bu araştırmaya Eylül 2016-Mayıs 2017 tarihleri arasında kalp yetmezliği tanısıyla Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Kampüsü Kalp Merkezi Kardiyoloji Servisinde ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Kardiyoloji Servisinde yatan ve Kardiyoloji Polikliniğine ayaktan başvuran 18 yaşından büyük, EKO ile düşük ejeksiyon fraksiyonu tespit edilmiş, bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (EK-2) alınarak 72 hasta dahil edildi. Örneklem boyutu “GPower” 3.0.1 versiyonu ile güç analizi yapılarak belirlendi. Çalışmaya düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY tanısı konulalı 1 yıldan fazla olan ve takip edilen hastalar dahil edildi. Çalışmaya hastaların BNP, proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidatif sistem parametreleri dahil edildi. Çalışmamızda laboratuvarıda ölçümünü yaptığımız BNP için kullandığımız referans aralığı 0-100 pg/ml’dir. Ancak, ESC kılavuzuna göre akut başlangıçlı olmayan kalp yetmezliği için kesim değeri 35 pg/mL’dir. Bu nedenle BNP değerleri 35 pg/mL’nin altında olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

3.2 Hasta Numunelerinin Alınması, Saklanması ve Analiz Numunelerinin Oluşturulması

Eylül 2017 tarihinden itibaren hastalardan eritrosit ve plazmada oksidatif sistem belirteç analizleri için 1 adet antikoagulan (K₂EDTA) içeren tam kan ve serumda proadrenomedüllin ve kopeptin analizleri için 1 adet antikoagulan içermeyen kan örnekleri alındı. Tam kan örnekleri 3500 devirde (RCF: 1166 x g) 5 dakika süreyle santrifüj edilerek plazma ve eritrosit olarak ayrıldı. Ayrılan plazma numuneleri analiz zamanına kadar -80 °C’de dondurularak saklandı. Eritrosit numuneleri % 0,9 NaCl izotonik çözeltisi ile yıkandıktan sonra analiz zamanına kadar -80 °C’de dondurularak saklandı. Serum örnekleri de kanlar 3500 (RCF: 1166 x g) devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilerek elde edildi ve analiz zamanına kadar -80 °C’de dondurularak saklandı. BNP ölçümleri KY tanısı ile takip edilen hastaların K₂EDTA-plazma örneklerinde rutin olarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Biriminde otoanalizör (Abbott, Architect i1000 SR, Architect BNP) cihazı ile yapıldı.

3.3 Deneylerde Kullanılan Gereçler

Sanyo Ultra Low MDF–U4086S derin dondurucu (–80 °C), Altus AL380 Derin Dondurucu (+4 °C), Unicam Helios–α UV–Vis Spektrofotometre, Harrier 18/80 soğutmalı santrifüj, Sorvall RMC 14 santrifüj, Sartorius Basic hassas terazi, Whirlmix 20 W vorteks, ELISA okuyucu ve yıkayıcı (ChemWell® 2910 Automated EIA and Chemistry Analyzer), Abbott Architect i1000 SR otoanalizör cihazı, Siemens ADVIA 1800/2400 model otoanalizörü, çeşitli hacimlerde ayarlanabilir hacimli otomatik pipetler ve cam pipetler, çeşitli boyutlarda cam ve polipropilen deney tüpleri, eritrosit ve plazmada oksidatif sistem belirteçlerinin ölçülmesinde kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma–Aldrich ve Merck Kimya şirketlerinden sağlandı.

3.4 Tam Kan, Plazma, Eritrosit ve Serumda Ölçümü Yapılan Parametrelere Ait Yöntemler

3.4.1 BNP Düzeyi Ölçüm Yöntemi

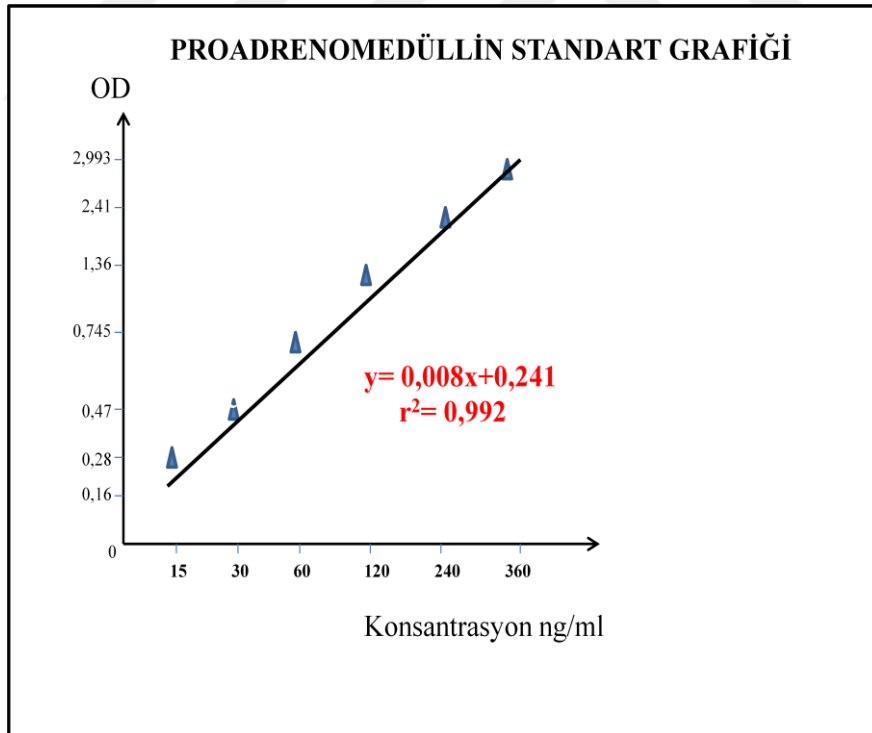
İnsan K₂EDTA-plazma örneklerindeki BNP düzeyleri Abbott Architect i1000 SR otoanalizör cihazında kit kullanılarak ölçülmüştür. Architect BNP ölçüm yöntemi bir kemiluminesan mikropartikül immunolojik analiz yöntemidir (CMIA). Yöntemde EDTA’lı plazmada BNP kantitatif tayini iki adımda gerçekleştirilmektedir. Numune ve anti-BNP antikoru kaplı paramanyetik mikropartiküller birleştirilir. Numunedeki BNP anti-BNP kaplı bu partiküllere bağlanır. Yıkamanın ardından, anti-BNP akridinyum isimli konjugat eklenerek bir reaksiyon karışımı elde edilir. Bir kez daha yıkama yapılır. Reaksiyon karışımına Pre-trigger ve trigger çözeltileri ilave edilir. Ortaya çıkan kemiluminesan reaksiyon bağıl ışık birimleri (RLU) olarak ölçülür. Numunedeki BNP konsantrasyonu ile bağıl ışık birimleri arasında pozitif ilişki bulunmaktadır.

3.4.2 Proadrenomedüllin Düzeyi Ölçüm Yöntemi

Human Proadrenomedullin (Pro-ADM) ELISA Kit (Sunredbio®) ile insan serumunda ELISA yöntemiyle kit prospektusuna uygun olarak çalışılmıştır. Kitin proadrenomedüllin saptama aralığı: 1,5-400 ng/ml’dir. Kitin çalışma içi (intra-assay) varyasyon katsayısı (CV) <%10 ve çalışmalar arası CV’si <%12’dir.

Kit, numunelerde insan proadrenomedüllin düzeyini ölçmek için çift antikorlu sandviç enzim bağlı immünosorbent analiz yöntemini kullanır. Kit içerisinde bulunan plakadaki kuyucuklar daha önceden proadrenomedüllin monoklonal antikoruna ile kaplanmış halde bulunmaktadır. Kuyucuklara hasta örnekleri ilavesinden sonra biotin ile işaretlenmiş proadrenomedüllin monoklonal antikoruna eklenmektedir. Belirli bir inkubasyondan sonra kuyucuklara streptavidin-HRP (“Horse Radish” Peroksidaz) enzimi ilave edilir. Reaksiyon için gerekli inkubasyon beklendikten sonra renklendirici reaktifler ilave edilir. Oluşan renkli çözeltinin 450 nm dalga boyunda absorbansı ölçülür. Absorbans ile serum proadrenomedüllin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır.

Deney sonunda, elde edilen standart optik dansiteleri ve kitede belirtilen karşılık gelen konsantrasyonları kullanılarak Pro-ADM standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.1). Bu standart grafiğinden de faydalanarak örnek optik dansiteleri, ng/ml'ye çevrilerek, örneklerin Pro-ADM konsantrasyonları tespit edilmiştir.



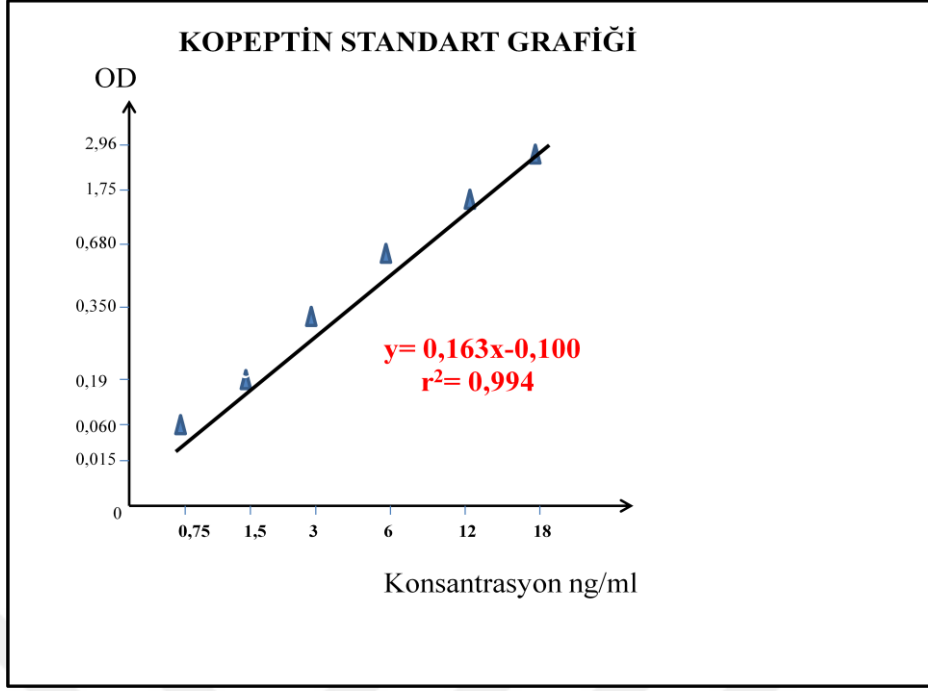
Şekil 3.1: Proadrenomedüllin standart grafiği.

3.4.3 Kopeptin Düzeyi Ölçüm Yöntemi

Human Copeptin (CPP) ELISA Kit (Sunredbio®) ile insan serumunda ELISA yöntemiyle kit prospektusuna uygun olarak çalışılmıştır. Kitin kopeptin saptama aralığı: 0,07-20 ng/ml'dir. Kitin çalışma içi (intra-assay) varyasyon katsayısı (CV) <%10 ve çalışmalar arası CV'si <%12'dir.

Kit, numunelerde insan kopeptin düzeyini ölçmek için çift antikorlu sandviç enzim bağlı immünosorbent analiz yöntemini kullanır. Kit içerisinde bulunan plakadaki kuyucuklar daha önceden kopeptin monoklonal antikoruna ile kaplanmış halde bulunmaktadır. Kuyucuklara hasta serumları ilavesinden sonra biotin ile işaretlenmiş kopeptin monoklonal antikoruna eklenmektedir. Belirli bir inkubasyondan sonra kuyucuklara streptavidin-HRP ("Horse Radish" Peroksidaz) enzimi ilave edilir. Reaksiyon için gerekli inkubasyon beklendikten sonra renklendirici reaktifler ilave edilir. Oluşan renkli çözeltinin 450 nm dalga boyunda absorbansı ölçülür. Absorbans ile serum kopeptin konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır.

Deney sonunda, elde edilen standart optik dansiteleri ve kitte belirtilen karşılık gelen konsantrasyonları kullanılarak CPP standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.1). Bu standart grafiğinden de faydalanarak örnek optik dansiteleri, ng/ml'ye çevrilerek, örneklerin CPP konsantrasyonları tespit edilmiştir.



Şekil 3.2: Kopeptin standart grafiği.

3.4.4 MDA Miktarı Ölçüm Yöntemi

MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve oksidatif stres göstergesi olarak sıkça kullanılan bir belirteçtir. MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile yüksek sıcaklık altında asidik ortamda tepkimeye girerek pembe renkli bir bileşik oluşturmaktadır. Bu bileşiğin optik dansitesi 532 nm dalga boyunda ölçülerek MDA düzeyi hesaplanmaktadır. MDA dışında çeşitli maddeler de bu tepkimeyi verebileceğinden TBA ile tepkimeye giren maddeler anlamında TBARS olarak da adlandırılmaktadır (331).

MDA ölçüm yönteminde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2,13 g Na_2HPO_4 ve 11,56 g KH_2PO_4 tartılarak distile suda çözüldükten sonra hacim distile suyla 1 L'ye tamamlanır. Trikloroasetik asit (TCA; % 20 w/v): 500 mL 0,6 N HCl içinde 100 g katı TCA çözülerek hazırlanır. TBA çözeltisi (% 2 w/v): 200 mg katı TBA 10 mL distile suda çözülür. Etil alkol (% 95; v/v).

Tablo 3.1: MDA ölçümünde kullanılan deney protokolü

	Numune	Kör
ERİTROSİT HEMOLİZATI VEYA PLAZMA	100 µl	100 µl
ETİL ALKOL	1 ml	1 ml
FOSFAT TAMPONU	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	-

30 dakika boyunca kaynar suda inkübe edilen deney tüpleri 4000 devirde 20 dk süreyle santrifüj edilir. Spektrofotometrik ölçüm sırasında kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi konulur. 532 nm dalga boyunda numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Bu ölçümde MDA standardı olarak tetraetoksipropan (TEP) kullanılır (% 96; d=0,92; MA= 220,3).

TEP molaritesinin hesaplanması:

$0,92 \times 1000 = 920$ g (TEP çözeltisinin 1 litresinin ağırlığı)

$920 : 100 \times 96 = 883,2$ g (1 litre çözeltideki TEP miktarı)

$883,2 : 220,3 = 4$ mol TEP (1 litre çözeltide 4 mol TEP olduğu için, çözeltideki TEP'in konsantrasyonu 4 molar)'dir.

4 M'lık çözelti etil alkolle 400.000 kat seyreltilerek, 10 µM'lık standart çözelti elde edilir. Aynı deney protokolü standart ve standart körü için uygulanır ve spektrofotometrede absorbanslar okunur. Buna göre 'Faktör' değeri aşağıda görüldüğü şekilde 161,3 olarak hesaplanır.

Standartın optik dansitesi (ODS) = 0,152

Standart körünün optik dansitesi = 0,090

$$\Delta ODS = 0,062$$

$$\text{MDA konsantrasyonu (nmol/ml)} = \Delta ODN \times \text{Standardın konsantrasyonu} / \Delta ODS$$

$$= \Delta ODN \times 10 \mu\text{M} / 0,062$$

$$= \Delta ODN \times 161,3$$

Elde edilen MDA değeri "nmol/ml" olarak belirtilir.

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \Delta OD \times 161,3$$

Çalışmamızda serum 100 μl yerine 200 μl olarak alınmıştır. Buna göre hesaplama plazma ve 50 kat seyreltilmiş eritrosit hemolizatında aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \Delta OD \times 161,3 \times (1/2)$$

$$= \Delta OD \times 80,65$$

Eritrosit hemolizati için sonuç 50 ile çarpılmıştır.

3.4.5 SOD Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

SOD, $\text{O}_2^{\bullet -}$ radikalini substrat olarak kullanmaktadır. Bu deneyin prensibi; ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan $\text{O}_2^{\bullet -}$ radikalinin ortamda bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğini indirgeyerek, menekşe renkli formazan bileşiği oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu bileşik spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına ilave edilen (doku homojenatında bulunan) SOD enzimi, oluşan $\text{O}_2^{\bullet -}$ radikallerini ortamdan uzaklaştırarak, aktivitesiyle doğru orantılı olarak NBT'nin indirgenmesini engellemektedir. Ortama SOD ilave edilerek bulunan absorbans değeri, enzimin ilave edilmediği kör deneyinin absorbansıyla karşılaştırılarak enzim aktivitesi hesaplanmaktadır (332, 333).

Kullanılan reaktiflerin içeriği:

Ksantin oksidaz çözeltisi: 3,2 M, 1 ml amonyum sülfat içinde, 10 μl KO çözülür.

CuCl_2 çözeltisi: 100 ml distile suda 108 mg CuCl_2 çözülür.

Reaktif 1: Aşağıdaki çözeltiler ayrı ayrı hazırlandıktan sonra birleştirilir. Toplam hacim 490 ml'dir.

9,1 mg ksantin, 1 N NaOH'den birkaç damla distile su içine damlatıldıktan sonra bu çözeltiye ilave edilerek çözülür, daha sonra distile su ile hacim 200 ml'ye tamamlanır.

100 ml distile suda 25 mg EDTA çözülür.

100 ml distile suda 12,3 mg NBT çözülür.

30 ml distile suda 30 mg sıgır albümini çözülür.

60 ml distile suda 2,54 g Na₂CO₃ çözülür.

En son işlem olarak tüm bu çözeltiler birleştirilerek Reaktif 1 elde edilir.

Tablo 3.2: SOD aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.

	Numune	Kör
REAKTİF 1	2,75 ml	2,75 ml
ERİTROSİT HEMOLİZATI	100 µl	-
KO	50 µl	50 µl

Tüpler oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

	Numune	Kör
CuCl₂	100 µl	100 µl
ERİTROSİT ÇÖZELTİSİ	-	100 µl

Bir SOD ünitesi (U), NBT'nin indirgenmesini % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Kör ve numunelere ait absorbanslar spektrofotometrede 560 nm'de distile suya karşı okunduktan sonra SOD aktivitesi şu şekilde hesaplanır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(ODKör - ODN) / ODKör] \times 100$$

$$SOD \text{ aktivitesi (U/ml)} = [(ODKör - ODN) / ODKör] \times 20 \times 50 \text{ (Eritrosit seyreltme faktörü)}$$

3.4.6 Katalaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

KAT, H_2O_2 'yi substrat olarak kullanır. Bu deneyin prensibi; KAT enziminin katalizlediği reaksiyon sırasında H_2O_2 'nin parçalanmasına eşlik eden absorbans azalmasının 240 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır (334).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu: KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 kullanılarak 50 mM, pH 7 olan fosfat tamponu hazırlanır.

H_2O_2 çözeltisi: Stok H_2O_2 çözeltisinden (% 30 v/v) 0,2 ml alınır, 100 ml fosfat tamponu ile seyreltilir.

2,99 ml H_2O_2 çözeltisi, 0,01 ml eritrosit hemolizatu ve 0,01 ml fosfat tamponu, kuvarz küvete konulur. Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda absorbans 1 dakika süreyle izlenir. Ortaya çıkan absorbans farkı (ΔOD) hesaplandıktan sonra KAT aktivitesi H_2O_2 'nin molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak hesaplanır. Buna göre, 'Faktör' değeri 7320 olarak bulunur.

KAT aktivitesi (IU/ml) = ($\Delta OD/dk$) x 7320 X 50 (Eritrosit seyreltme faktörü)

3.4.7 Ksantin Oksidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

KO enzimi ksantini yıkıma uğratarak ürik asit meydana getirmektedir. Bu ölçüm yönteminin prensibi KO enzim aktivitesi sonucunda açığa çıkan ürik asidin optik dansitesinin 293 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Birim zamanda oluşan ürik asit miktarı üzerinden KO aktivitesi hesaplanır (335).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (pH 7,5; 0,5 mM Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA); 50 mM fosfat): 93 mg EDTA (disodyum tuzu, dihidrat), 3 g Na_2HPO_4 ve 0,5 g KH_2PO_4 distile suda çözülür ve hacim 500 ml'ye tamamlanır.

Ksantin çözeltisi (2 mM): 25 ml fosfat tamponunda 7,6 mg ksantin çözülür.

Tablo 3.3: KO aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.

FOSFAT TAMPONU	2,8 ml
KSANTİN ÇÖZELTİSİ	0,1ml
ERİTROSİT HEMOLİZATI VEYA PLAZMA	0,1ml

Tablo. 3.3'te gösterilmiş olan deney protokolü hazırlandıktan sonra örneklerin optik dansitesi 293 nm dalga boyunda kuvartz küvet kullanılarak distile suya karşı oda sıcaklığında 1. ve 20. saat sonunda ölçülür. 1. ve 20. saatler arasındaki ölçümler arasındaki optik dansite farkı (ΔOD) ve ürik asitin molar absorpsiyon katsayısından faydalanılarak aşağıdaki formüle göre KO enzim aktivitesi hesaplanır:

$$\epsilon_{\text{ürük asit}} = 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\Delta OD_{\text{ürük asit}} = \epsilon_{\text{ürük asit}} \times C_{\text{ürük asit}} \times l$$

$$C_{\text{ürük asit}} = \Delta OD_{\text{ürük asit}} / (\epsilon_{\text{ürük asit}} \times l)$$

$$C_{\text{ürük asit}} = \Delta OD_{\text{ürük asit}} / (10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm})$$

$$C_{\text{ürük asit}} = \Delta OD_{\text{ürük asit}} / 10^4 \text{ L/mol} = \Delta OD_{\text{ürük asit}} \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$C_{\text{ürük asit}} = \Delta OD_{\text{ürük asit}} \times 10^2 \text{ } \mu\text{mol/L}$$

1 IU KO aktivitesi, IU'nun tanımı gereği 1 $\mu\text{mol/dk}$ ürik asit oluşmasını sağlayan enzim aktivitesi olduğundan 1 IU/L KO = 1 $\mu\text{mol}/(\text{dk} \times \text{L})$ ürik asit oluşumuna karşılık gelmektedir.

$$KO \text{ (IU/L)} = \Delta OD_{\text{ürük asit}} \times 10^2 \text{ } \mu\text{mol/L} \times [1/t \text{ (dakika}^{-1})] \times 30 \text{ (Seyreltme Oranı)}$$

Tepkime süresi 1140 dk (1 ve 20. saatler arası) olduğundan; serumda KO aktiviteleri şu formüle göre hesaplanır:

$$KO \text{ (mIU/mL)} = (\Delta OD/1140) \times 3000$$

Eritrosit hemolizati için sonuç 50 ile çarpılmıştır.

3.4.8 Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

GSH-PO; $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$ reaksiyonunu katalizlemektedir. Döngünün devam edebilmesi için yükseltgenmiş GSH'nin tekrar indirgenmesi gerekmektedir. Glutasyon redüktaz enzimi, yükseltgenmiş GSH'ı indirgerken aynı zamanda NADPH'ı yükseltgeyerek, NADP'ye dönüşümünü sağlamaktadır (336). Spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda NADPH absorbans vermektedir. NADP'ye dönüşüm nedeniyle absorbanstaki azalma GSH-PO aktivitesinin ölçümüne olanak sağlamaktadır.

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (ph:7, 50 mM fosfat, 5,6 mM EDTA): 2,08 g EDTA, 4,2 g Na_2HPO_4 ve 2,72 g KH_2PO_4 1 litre distile suda çözülerek hazırlanır.

Glutasyon çözeltisi: 250 mg glutasyon 5 ml fosfat tamponunda çözülür.

NADPH: 15 mg NADPH 2,5 ml fosfat tamponunda çözülür.

Glutasyon redüktaz enzimi: 3,2 M, 1 ml amonyum sülfatta, 10 µl glutasyon redüktaz enzimi seyreltilir.

H_2O_2 çözeltisi: 5 ml fosfat tamponuna, 15 µl H_2O_2 stok çözeltisi (% 30 v/v) ilave edilir.

Sodyum azid: 5 ml fosfat tamponunda 65 mg sodyum azid çözülür.

Tablo 3.4: Glutasyon Peroksidaz aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.

FOSFAT TAMPONU	2,5 ml
GSH	100 µl
NADPH	50 µl
GSH REDÜKTAZ	100 µl
SODYUM AZİD	100 µl
ERİTROSİT HEMOLİZATI VEYA PLAZMA	100 µl

Spektrofotometre 340 nm dalga boyuna ayarlanır ve fosfat tamponuyla sıfırlanır. Protokoldeki maddeler küvete konulduktan sonra 1 dakika süreyle absorbans takip edilir ve böylece kör değeri elde edilir. Aynı işlem 100 µl H₂O₂ çözeltisi eklenerek tekrar edilir ve bu kez numune değeri bulunur. Numune ile 1 dk'da elde edilen ΔOD değerinden, kör ile 1 dk'da elde edilen ΔOD değeri çıkarılarak absorbans farkı (ΔOD) hesaplandıktan sonra GSH-PO aktivitesi NADPH'nin molar absorpsiyon katsayısı ($\epsilon = 6,22 \cdot 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$) kullanılarak hesaplanır. Buna göre, Faktör değeri 4800 olarak bulunur.

GSH-PO aktivitesi (IU/L) :

$\Delta OD \times (1/\epsilon_{\text{NADPH}}) \times (V_{\text{toplaml}}/V_{\text{numune}}) \times (1/\text{zaman (dk)}) \times \text{Seyreltme Faktörü}$

GSH-PO aktivitesi (IU/L) = ($\Delta OD/\text{dk}$) x 4800

Eritrosit hemolizati için sonuç 50 ile çarpılmıştır.

3.4.9 Kreatinin ve GFH ölçümü

Kreatinin, alkali ortamda pikrik asitle kreatininin reaksiyona girdiği ve kırmızı renkli bir kreatinin-pikrat kompleksi oluşturduğu Jaffe yöntemi ile otoanalizörde ölçülmüştür. GFH, CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) formülü ile hesaplanmıştır (337). Kreatinin ve GFH ölçümleri ayrıca yapılmamış olup hastaların rutin takipleri sırasındaki laboratuvar sonuçlarından faydalanılmıştır.

3.5 İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel analizi 'SPSS 11.5 for Windows' paket programıyla yapılmıştır.

Parametrik test varsayımları sağlanmadığında, tanımlayıcı istatistikler; dağılımı normal olmayan değişkenler için median (min – maks) olarak gösterilmiştir. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Belirteçlerin korelasyonunun incelenmesinde ise Spearman Korelasyon Analiz testi kullanılmıştır.

Parametrik test varsayımları sağlandığında, tanımlayıcı istatistikler; dağılımı normal olan değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir. İki grup arasındaki farkların önemliliği araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Student's t testi uygulanmıştır. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Tablo 4.1: Çalışmaya katılan hastalarda ölçülen parametrelerin incelenmesi

	Tüm hastalar	
	n:72	
	Ortalama ± SS	Ortanca (Min-Maks)
Yaş (yıl)	70,87± 11,53	72 (42 – 89)
BNP (pg/ml)	1135,89 ± 918,26	842,3 (54,7 – 3758)
Pro-ADM (ng/ml)	74,34 ± 52,89	59,13 (6,75 – 237,26)
Kopeptin (ng/ml)	7,22 ± 3,9	6,3 (0,12 – 17,87)
Eritrosit MDA (nmol/ml)	396,42 ± 116,28	407,28 (108,87 - 653,26)
Eritrosit SOD (IU/ml)	1612,21 ± 822,17	1697,77 (70,42 – 3361,34)
Eritrosit KAT (IU/ml)	44723,51 ± 7193,94	45750 (22326 - 57828)
Eritrosit GSH-PO (IU/ml)	15,83 ± 2,14	16,08 (9,84 – 19,68)
Eritrosit KO (mIU/ml)	4,38 ± 1,89	4,19 (1,16 – 13,38)
Plazma MDA (nmol/ml)	2,3 ± 1,02	2,25 (0,64 – 5,88)
Plazma GSH-PO (IU/ml)	118,36 ± 25,97	120 (62,4 – 2481,6)
Plazma KO (mIU/ml)	1,9 ± 2,02	1,2 (0,05 - 9,85)
Kreatinin (mg/dl)	1,55± 0,99	1,27 (0,54 – 7,34)
GFH (ml/dk/1,73 m²)	52,54 ± 28,2	48 (7 – 110)

Tablo 4.2: Cinsiyetlere göre hasta verilerinin dağılımı.

	Erkek n:36 Ortalama $\pm$ Standart sapma	Kadın n:36 Ortalama $\pm$ Standart sapma	p
Yaş (yıl)	69, 62 $\pm$ 10,7	72,12 $\pm$ 12,06	0,258
Kreatinin (mg/dl)	1,73 $\pm$ 1,14	1,37 $\pm$ 0,79	0,135
GFH (ml/dk/1,73 m²)	53,02 $\pm$ 27,45	52,06 $\pm$ 28,49	0,752
BNP (pg/ml)	1191,89 $\pm$ 1031,41	1107,92 $\pm$ 973,68	0,621
Pro-ADM (ng/ml)	73,02 $\pm$ 54,62	75,66 $\pm$ 51,50	0,939
Kopeptin (ng/ml)	6,97 $\pm$ 3,79	7,48 $\pm$ 4,05	0,712
Eritrosit MDA (nmol/ml)	381,61 $\pm$ 122,44	411,24 $\pm$ 122,44	0,291
Eritrosit SOD (IU/ml)	1613,39 $\pm$ 849,89	1611,03 $\pm$ 789,20	0,990
Eritrosit KAT (IU/ml)	43375,4 $\pm$ 6957,4	46071,63 $\pm$ 7194,7	0,051
Eritrosit GSH-PO (IU/ml)	15,93 $\pm$ 1,88	15,73 $\pm$ 2,50	0,905
Eritrosit KO (mIU/ml)	4,17 $\pm$ 2,09	4,6 $\pm$ 1,59	0,060
Plazma MDA (nmol/ml)	2,39 $\pm$ 0,995	2,22 $\pm$ 1,03	0,459
Plazma GSH-PO (IU/ml)	117,89 $\pm$ 25,87	118,83 $\pm$ 27,83	0,881
Plazma KO (mIU/ml)	2,07 $\pm$ 2,26	1,73 $\pm$ 1,8	0,862

Hastalar böbrek fonksiyonları açısından cinsiyetlere göre karşılaştırıldığında cinsiyetler arası kreatinin ve GFH değerlerinin istatistiksel olarak farklı olmadığı izlendi. Çalışmamızda BNP, Pro-ADM, kopeptin ve oksidan/antioksidan sistem belirteçleri düzeyleri de cinsiyetler arası anlamlı farklılık göstermedi.

Tablo 4.3’de BNP düzeyleri ile proadrenomedüllin, kopeptin düzeyleri arasındaki korelasyon gösterilmektedir. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4.3: BNP konsantrasyonu ile proadrenomedüllin ve kopeptin düzeylerinin korelasyonlarının incelenmesi.

	Pro-ADM (ng/ml)	Kopeptin (ng/ml)
BNP (pg/ml)	$r_s:0,016$	$r_s:0,067$
	$p:0,864$	$p:0,59$
Pro-ADM (ng/ml)		$r_s:0,799$
		$p:0,0001$

r_s : Korelasyon katsayısını göstermektedir.

p : Anlamlılık değeri

Tablo 4.4: BNP konsantrasyonu ile oksidatif stres ve antioksidan savunma belirteçlerinin korelasyonlarının incelenmesi.

	BNP	eMDA	eKAT	eSOD	eGSH-PO	eKO	PMDA	PGSH-PO	PKO
	pg/ml	nmol/ml	IU/ml	IU/ml	IU/ml	mIU/ml	nmol/ml	IU/ml	mIU/ml
BNP		$r_s:-0,01$	$r_s:0,008$	$r_s:0,31$	$r_s:0,077$	$r_s:-0,25$	$r_s:0,03$	$r_s:-0,20$	$r_s:-0,13$
		$p:0,93$	$p:0,94$	$p:0,009^*$	$p:0,52$	$p:0,03^*$	$p:0,75$	$p:0,08$	$p:0,26$
eMDA			$r_s:0,3$	$r_s:-0,1$	$r_s:0,45$	$r_s:0,35$	$r_s:0,52$	$r_s:-0,28$	$r_s:-0,42$
			$p:0,01^*$	$p:0,4$	$p:0,0001^*$	$p:0,002^*$	$p:0,000^*$	$p:0,01^*$	$p:0,000^*$
eKAT				$r_s:0,03$	$r_s:0,38$	$r_s:-0,2$	$r_s:0,11$	$r_s:-0,19$	$r_s:-0,05$
				$p:0,77$	$p:0,001^*$	$p:0,09$	$p:0,36$	$p:0,11$	$p:0,66$
eSOD					$r_s:0,07$	$r_s:0,02$	$r_s:0,11$	$r_s:0,04$	$r_s:-0,09$
					$p:0,53$	$p:0,98$	$p:0,36$	$p:0,69$	$p:0,43$
eGSH-PO						$r_s:-0,41$	$r_s:0,23$	$r_s:-0,06$	$r_s:-0,27$
						$p:0,000^*$	$p:0,03^*$	$p:0,56$	$p:0,02^*$
eKO							$r_s:-0,12$	$r_s:0,09$	$r_s:0,29$
							$p:0,30$	$p:0,44$	$p:0,013^*$
PMDA								$r_s:-0,27$	$r_s:-0,30$
								$p:0,02^*$	$p:0,01^*$
PGSH-PO									$r_s:0,03$
									$p:0,77$

“e” Eritrositteki, “P” plazmadaki ölçümleri ifade etmektedir. r_s : Korelasyon katsayısını göstermektedir. “*” İstatistiksel olarak anlamlı ilişkiyi göstermektedir.

Tablo 4.4’de BNP ile oksidan ve antioksidan savunma sistemi belirteçleri arasındaki korelasyon gösterilmektedir. BNP ile bu parametrelerin ve diğer parametrelerin kendi aralarındaki korelasyonların incelenmesinde Spearman Korelasyon Analiz testi kullanılmıştır. BNP ile eritrosit SOD aktivitesi arasında pozitif yönde, eritrosit KO aktivitesi ile negatif yönde anlamlı ilişki izlendi. BNP ile eritrosit KAT aktivitesi, eritrosit GSH-PO aktivitesi, plazma MDA konsantrasyonu, proadrenomedüllin ve kopeptin düzeyleri arasında pozitif yönde ama anlamlı olmayan ilişki bulundu. Yine BNP ile eritrosit MDA konsantrasyonları, plazma GSH-PO aktivitesi ve plazma KO aktivitesi arasında negatif yönde ama anlamlı olmayan ilişki olduğu gözlemlendi. Proadrenomedüllin ile kopeptin arasındaki ilişki pozitif yönde

yüksek oranda anlamlı ($p<0,001$, r_s : 0,799) olarak bulundu. Çalışmada en yüksek ilişki düzeyi bu iki belirteç arasında bulundu.

Oksidatif belirteçlerden eritrosit MDA konsantrasyonu, eritrosit GSH-PO aktivitesi, eritrosit KAT aktivitesi, eritrosit KO aktivitesi, plazma MDA konsantrasyonu ile pozitif yönde, plazma KO aktivitesi ve plazma GSH-PO aktivitesi ile negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdi ($p<0,05$). Antioksidan enzimlerden eritrosit GSH-PO aktivitesi diğer bir antioksidan enzim olan KAT ile pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterdi ($p<0,05$). Eritrosit GSH-PO aktivitesinin aynı zamanda eritrosit ve plazma MDA konsantrasyonları ile pozitif yönde anlamlı ilişkisi bulundu. Yine eritrosit GSH-PO aktivitesinin, eritrosit ve plazma KO aktivitesi ile negatif yönde anlamlı ilişkisi bulundu ($p<0,05$).



5. TARTIŞMA

Kalp yetmezliği, kardiyovasküler hastalıklar içerisinde yer alan birçok belirti ve bulguya sahip yaşamı tehdit eden bir sağlık sorunudur. Ülkemizde yapılan HAPPY çalışmasına göre 2 milyonun üzerinde birey kalp yetmezliği (KY) tanısı ile yaşamaktadır (1). AHA 2012'den 2030 yılına kadar KY'de yaklaşık % 46'lık bir artış beklendiğini; 2030 yılında ABD'de 18 ve üzeri yaş grubunda 8 milyondan fazla bireyde (2011 yılında 5,8 milyon bireyde mevcut) KY görüleceğini öngörmüştür (2, 3). KY kabaca kalbin pompalama fonksiyonunu kaybetmesi ve dokuların yeterince beslenememesi aynı zamanda pompalanamayan kanın bazı organlarda patolojik değişikliğe yol açmasıyla birçok semptom ve bulgunun görüldüğü bir sendromdur. KY'nin gelişmesinde birçok neden suçlanmaktadır (35).

KY tanısında, klinik sürecin izleminde ve tedaviye cevabın takibinde KY nedenlerine bağlı olarak ortaya çıkan bulgular ve kardiyak fonksiyonların bozulmasına bağlı artan veya azalan birçok belirteç tanıya yardımcı olması açısından kullanılmaktadır. Kalbin KY açısından yapısal ve fonksiyonel incelemesinde ekokardiyografinin (EKO) önemli bir yeri bulunmaktadır. EKO sırasında kardiyak yapısal incelemenin yanı sıra kalbin pompalama fonksiyonu da ölçülmektedir. Ventrikül fonksiyonuna göre KY iki grup olarak değerlendirilmektedir. Birincisi düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp kasının kasılmasının bozulduğu sistolik kalp yetmezliği, diğeri ejeksiyon fraksiyonun korunduğu ventrikül doluş bozukluğunun olduğu diastolik kalp yetmezliğidir. Ejeksiyon fraksiyonu sistolik volümün diyastol sonu volüme oranıdır ve iyi bir sistolik fonksiyon göstergesidir. Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC)'nin 2016 yılında yayınladığı kılavuza göre sol ventrikül EF $\geq$ % 50 ise korunmuş ejeksiyon fraksiyon, sol ventrikül EF $<$ % 40 ise düşük ejeksiyon fraksiyon olarak tanımlanmıştır. % 40-49 arası değerler gri bölge olarak belirtilmiştir (35).

KY tanısında yapılan biyokimyasal çalışmalarda tanı ve prognozu göstermesi açısından tek bir test bulunmamaktadır. Mevcut testlerin de tanısal doğruluğu klinik bulgulara göre genellikle yetersiz bulunmuştur (6). Natriüretik peptidlerin güvenilir tanı ve prognostik araçlar olduğu gösterilmesine rağmen, bu belirteçlerin kronik kalp yetmezliği için medikal tedavinin yönetiminde yardımcı olarak kullanılabileceği belirsizliğini korumuştur (7). Yine de natriüretik peptidler KY tanı ve takibinde en sık kullanılan belirteç özelliklerini korumaktadır. EF'nin % 45'in altında azalan değerleri için anlamlı mortalite artışı olduğu izlenmiştir (46). Sol ventrikül fonksiyon bozukluğu olan asemptomatik hastalarda bile BNP düzeylerinin arttığı görülmüştür (338). Yapılan bir çalışmada asemptomatik hastalarda sadece BNP ölçümü

ile yapılan taramanın hastaların KY tanı ve tedavisine yardımcı olabileceği belirtilmiş fakat düşük ejeksiyon fraksiyonunun göstergesi olarak daha ileri incelemelere ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (339). Acil servislerde de kalp yetmezliği hastalarının ayırıcı tanısında ve takibinde BNP çok yararlı bir belirteçtir. Acil servise akut dispne şikayeti ile gelmiş hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada artmış BNP düzeylerinin (>100 pg/ml) KY tanısında duyarlılığının % 86, negatif prediktif değerinin % 96 olduğu saptanmıştır (55).

Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi BNP halen KY tanısı ve klinik izleminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda BNP'nin KY hastalarındaki bu değişimlerini izlerken esas olarak KY tanı alt gruplarından olan düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği tanılı hastaların BNP düzeyleri ile proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidatif sistem içerisinde yer alan belirteçlerin ilişkisini inceledik. Literatürde proadrenomedüllin ve kopeptin peptidlerinin KY'deki durumlarını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu sebepten dolayı korelasyon incelemelerinde ve gruplar arası karşılaştırmalarda, proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidatif sistem belirteçlerinin BNP ile olan ilişkilerine odaklanıldı. Bu parametrelerin BNP ile beraber klinik kullanımlarına yönelik aydınlatıcı bir çalışma planlandı. Bu çalışmayı sınırlandıran birkaç nokta bulunmaktadır. Birincisi KY'li hastalara eşlik eden hastalıkların BNP ve çalışmadaki diğer parametrelerin düzeyleri üzerine olan etkileri incelenmemiştir. Bu çalışma KY'nin eşlik edebilecek hastalıklarla beraber olmasının klinik takipte prognostik durumlarını ve mortalite üzerine etkilerini ortaya koymak açısından proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidatif stres belirteçlerinin periyodik olarak ölçümünün yapılacağı çalışmalar için yol gösterici olma özelliği taşımaktadır.

Proadrenomedüllin peptidinin de KY'nin kliniği ile ilişkisi olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (17, 18, 119, 120). NYHA'ya göre sınıflandırılan konjestif kalp yetmezliğinde, sınıf I'den IV'e doğru plazma adrenomedüllin düzeylerinin arttığı bildirilmiştir, ancak bu ilişkinin, hastalığın farklı evrelerini tanısal açıdan ortaya koymada güçlü olmadığı belirtilmiştir (17, 120). Akut KY'li hastalarda yapılan bir başka çalışmada ise MR-ProADM'nin mortalite ile ilişkili olduğu ve prognozu göstermede natriüretik peptidlere göre daha iyi olduğu belirtilmiştir (18). Proadrenomedüllin ve MR-ProADM düzeylerinin ölçümü, daha kararlı bir yapı ve uzun bir yarılanma ömrüne sahip olması nedeniyle ADM ölçümü yerine tercih edilmektedir. ADM'nin birçok kardiyovasküler olayda arttığı görülmektedir. ADM düzeylerinin esansiyel hipertansiyon (107, 109, 340), akut miyokard infarktüsü (110, 111), serebrovasküler hastalıklar (112), kalp yetmezliği (17), konjestif kalp yetmezliği (113), preeklampsi (114), hemorajik şok (115), pulmoner hipertansiyon (116), mitral kapak darlığı

(108) ve subaraknoid kanamada (117) arttığı görülmüştür (118). MR-ProADM çeşitli kardiyovasküler parametrelerle arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada MR-ProADM konsantrasyonları erkeklerde düşük ejeksiyon fraksiyonu ile anlamlı pozitif korelasyon göstermiş, kadınlarda ise ilişki daha zayıf bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (341).

Bizim çalışmamızda KY hastalarında proadrenomedüllin düzeyleri BNP düzeyleri ile pozitif yönde zayıf bir korelasyon gösterdi. Ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gegenhuber ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada akut stabil olmayan KY hastalarında 1 yıllık mortaliteyi öngörme açısından MR-ProANP (Mid Regional Pro A tipi natriüretik peptit), MR-Pro ADM ve kopeptin BNP ile karşılaştırılmış ve sonucunda BNP ile MR-Pro ADM arasında anlamlı korelasyon ($p<0,001$, $r_s:0,346$) bulunmuştur (24). Aynı çalışmada MR-Pro ADM ile kopeptin arasında da anlamlı korelasyon ($p<0,001$, $r_s:0,627$) izlenmiştir. Bizim çalışmamızda Gegenhuber ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak BNP ile proadrenomedüllin arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır ($p>0,05$, $r_s: 0,016$). Bununla birlikte proadrenomedüllin ve kopeptin arasında pozitif yönde güçlü ve anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir ($p<0,001$, $r_s: 0,799$) .

Yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığı gibi fizyolojik faktörler BNP'nin plazma düzeylerini etkiler, artan yaşla birlikte muhtemelen kardiyak değişikliklere bağlı olarak plazma BNP düzeyleri artar. Kadınlarda BNP düzeyleri erkeklere kıyasla, muhtemelen hormonal faktörlerle ilişkili olarak biraz daha yüksek bulunmuştur (55). Ancak bizim çalışmamızda cinsiyetler arası BNP ve proadrenomedüllin değerlerinde anlamlı fark izlenmedi.

BNP fizyolojik olarak natriüretik etki göstermektedir. Böbrek arteriollerinde doğrudan vazodilatasyon yaparak GFH'yi artırıcı etki gösterebilmektedir (342). Proadrenomedüllin ve BNP renal kan akımını artırmakta ve her ikisinde sodyum atılımını artırmaktadır. Bu etkilerini doğrudan böbrek arteriollerinden gösterebilmektedirler. Proadrenomedüllinin orta bölge fragmanı esas olarak vazodilatasyon ve inotropik etki göstermektedir. Adrenomedüllin ise daha çok kan hacmi düzenlenmesi ve elektrolit dengesinden sorumludur. Yapılan çalışmalarda adrenomedüllin ile plazma renin aktivitesi, aldosteron konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon, sodyum atılımı, glomerular filtrasyon hızı ve kreatinin klirensi ile negatif korelasyon bulunmuştur (102-104). GFH, KY hastalarında gelişen hemodinamik değişimlere bağlı olarak bilindiği üzere azalma göstermektedir. Bizim çalışmamızda BNP kreatinin ile pozitif yönde (korelasyon katsayısı: 0,245, $p<0,05$), GFH ile negatif yönde (korelasyon

katsayısı: 0,948, $p < 0,001$) anlamlı olarak korelasyon gösterdi. Pro-ADM ise kreatinin ve GFH ile anlamlı ilişki göstermedi ($p > 0,05$). Proadrenomedüllin GFH ile negatif ilişki içerisinde olsa da bazı hayvan çalışmalarında farklı dozlarda verilen adrenomedüllinin GFH'yi etkilemediği görülmüştür (343). Bizim çalışmamızın sonuçları da bu bulguyu desteklemektedir.

Kopeptin ADH hormonunun C terminal parçasını da içeren, plazmada ADH düzeylerinin belirteci olarak kullanılabilen bir glikopeptiddir. ADH hormonunun etkilendiği kan hacmi değişikliklerinden kopeptin de etkilenebilmektedir. KY'li hastalarda kardiyak debinin azalmasına bağlı aortik ve karotid baroreseptörlerin uyarılması sonucunda ADH'n artışına paralel olarak artış göstermiştir (128). Son zamanlarda kopeptinin KY'li hastaların prognozunun takibinde mortalitelerinin öngörülmesinde kullanımına yönelik çalışmalar yapılmıştır (142, 143). Kopeptin özellikle akut miyokard infarktüsü sonrası erken dönemde artış gösterebilmektedir. Kopeptinin GFH'den etkilenmediğine yönelik çalışmalara rağmen (134), böbrek fonksiyon bozukluğunun yaş, cinsiyet, diüretik ilaç kullanımı ve GFH'den bağımsız bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (131-133). Çalışmamızda kopeptin düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY hastalarında BNP ile pozitif yönde korele bulundu ama bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı olmadı ($p > 0,05$). Çalışmamızda BNP değerleri kreatinin ve GFH ile anlamlı korelasyon göstermesine rağmen kopeptin değerlerinin literatür bulgularıyla uyumlu şekilde bu parametreler ile anlamlı ilişkisi bulunmadı. Literatürde kopeptin ile ilgili yapılan mortalite ve prognoz çalışmalarında BNP ile karşılaştırılan kopeptinin KY'nin prognozunu göstermede, kısa ve uzun dönemli mortaliteyi öngörmede anlamlı artışlar gösterdiği izlenmiştir (344, 345). Bu çalışmalarda kopeptinin BNP ya da NT-ProBNP ile anlamlı korelasyon gösterdiği de gözlenmiştir. Fakat bizim çalışmamızda kopeptin BNP'den daha çok proadrenomedüllin ile yüksek derecede anlamlı korelasyon gösterdi.

Çalışmamızda kopeptinin BNP ile korelasyonu incelenirken hastaların klinik prognozları ve mortaliteleri değerlendirilmedi. Kopeptin bir ADH hormonu gibi akut stres durumlarında da artış gösterebilmektedir. Çalışmamız süresince hastalarımızın değişen klinik durumlarının kopeptin ve BNP düzeylerine etkilerini değerlendirmek açısından ayrıca farklı ölçümler yapılmamıştır. Çalışmada esas olarak kopeptin düzeylerinin eş zamanlı BNP ile ilişkisi incelenmiştir. Kopeptinin, mortalite öngördürücüsü ve prognostik gücü açısından KY'nin bu alt tanı grubundaki hastalarda yapılmış çalışmaları bulunmaktadır (346, 347). BNP'nin KY kliniği takiplerinde kopeptine göre yaygın olarak kullanılması, hatta BNP düzeylerine göre

tedavi planlamaları yapılması KY hastalarında BNP üzerine yapılan çalışmaların daha kapsamlı yapıp, daha verimli sonuçlar alınmasına neden olmuş olabilir. Kopeptin gibi, hemodinamik etkileri iyi bilinen ADH hormonunun belirteci olan bir glikopeptidin BNP'nin kullanım alanlarına yönelik rutin klinik uygulamaya girmesi için eşlik eden hastalıkların da göz önüne alındığı, seri kopeptin takiplerinin yapıldığı çalışmalar yapılabilir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sol ventrikül remodellingi ve yetmezliğinin ilerlemesinin, konjestif kalp yetmezliği ile karakterize sol ventrikül sistolik disfonksiyonunun nedenleri arasında oksidatif stresin de olduğunu göstermiştir. Bu yüzden KY'nin durumunu değerlendirmek için oksidatif stres belirteçleri ölçülmektedir (19-23). ROT'ların klinik olarak kardiyovasküler hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanımı sınırlı kalmıştır. ROT'ların bu süreçte klinik olarak kullanımının faydalarını destekleyecek yeterli çalışma bulunmamaktadır. Örnek olarak koroner iskemisi bulunan hastalarda azalmış glutatyon peroksidaz-1 enziminin 5 yıllık kardiyovasküler olay görülme insidansını artırdığı görülmüş (224). Kardiyovasküler hastalıklarda ROT'ların etkilerini daha net gösterebilmek için görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Florasan probalar ve elektron spin rezonans problemleri kullanılarak bu etkiler ortaya konulmaya çalışılmıştır (221, 222). Ama ROT'ları göstermede yetersiz kaldığı için hayvan ve insan çalışmaları sınırlı kalmıştır. Yine akut miyokard infarktüsü vakalarında artan 8-OHdG düzeylerinin gelişebilecek kardiyovasküler olayları öngörmede faydalı olduğu görülmüştür (226, 227).

Uzun süredir yapılan çalışmalar KY'nin sadece akut olaylardan ibaret olmadığını sonrasında kardiyak iyileşme sürecindeki patolojik değişikliklerin de KY'nin kötüleşmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir. KY'nin klinik takibindeki bu değişimlere oksidatif stresin de neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (228, 229). Glutatyon peroksidaz enziminin aşırı sekrete edildiği farelerde sol ventrikül fonksiyonlarının korunduğu görülmüştür (238). Aynı zamanda hayvan deneylerinde kullanılan antioksidanların miyosit hasarını sınırlandırdığı izlenmiştir (239-247).

KY ile oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemi arasındaki tüm bu ilişkilere rağmen oksidatif stres göstergesi olan MDA konsantrasyonları, KO enzim aktivitesi ve antioksidan savunma belirteçleri olan SOD, KAT ve GSH-PO enzim aktiviteleri ile yaygın klinik kullanıma sahip BNP arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya yönelik bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. BNP'nin hala yaygın olarak kullanılan bir KY klinik belirteci olması nedeniyle çalışmamızda oksidan/antioksidan sistem parametrelerinin verimli olarak

kullanılabilirliğini ortaya koymayı amaçladık.

Yaptığımız çalışmada KO enzim aktivitesinin eritrosit ve plazma düzeylerini ölçtük. Eritrosit KO aktivitelerinin BNP düzeyleri ile negatif yönde anlamlı olarak ilişkisi olduğunu tespit ettik ($p<0,05$, r_s : -0,25). Aynı zamanda SOD enzim aktivitesi de BNP ile pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterdi ($p<0,05$, r_s : 0,26). Oksidatif hasara karşı ilk ve büyük savunma mekanizması olan SOD enziminin artışını özellikle ilerlemiş KY kliniğinde gösteren çalışmayla sonuçlarımız uyumlu olarak değerlendirildi (311). Genel olarak yüksek BNP düzeylerine sahip olan hastalar klinik olarak ileri evre bulgulara sahip hastalardır. Muhtemelen KY gelişiminin etyolojisinde süperoksit substratlarının fazla olması adaptif olarak SOD enzim aktivitesinin artışına katkıda bulunmuş olabilir. Çalışmamızda da BNP düzeyleri ile eritrosit SOD aktiviteleri arasında saptanan pozitif ve anlamlı korelasyon adaptif mekanizmayla açıklanabileceği gibi BNP molekülünün eritrositlerde SOD enzim aktivitesini doğrudan artırıcı etkisine de işaret edebilir. Aynı zamanda BNP, nitrik oksit gibi guanilat siklaz yolağı üzerinden gösterdiği etkilere bağlı olarak SOD enzim aktivitesinde artışa sebep olmuş olabilir. BNP ile eritrosit KO aktiviteleri arasındaki negatif ve anlamlı korelasyon, BNP molekülünün eritrositlerde süperoksit kaynağı olan bu enzimin aktivitesini azaltarak süperoksit miktarını azalttığını düşündürmektedir. Landmesser ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KY hastalarında hücre dışı SOD aktivitesi azalmış ve KO aktiviteleri artmış olarak izlenmiştir (312). Aynı çalışmada artmış SOD salınımı olan durumlarda SOD aktivitesinin artmış gibi görülebileceği ama gerçekte toplam SOD enzim miktarının azaldığı belirtilmiştir (312).

Lipid oksidasyon ürünlerinden MDA'nın da sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile ters orantılı olduğu görülmüştür (307, 308). Bu çalışmalarda MDA'daki azalmanın KY kliniğinin iyileşmesi ile bir arada olduğu gösterilmiştir (307, 308). Başka bir çalışmada tedaviye yanıt veren hastalarda MDA düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir (309). Çalışmamızda hastaların MDA düzeyleri BNP ile anlamlı ilişki içerisinde olmamıştır. Ama eritrosit MDA düzeyleri eritrosit katalaz aktivitesi ve eritrosit glutatyon peroksidaz aktiviteleri gibi antioksidan göstergeler ile pozitif yönde korele bulundu. Yine eritrosit MDA konsantrasyonları eritrosit KO ile pozitif yönde plazma KO düzeyleri ile negatif yönde korele bulundu.

NYHA sınıflamasına göre ilerleyen evrelerde glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin azaldığı ortaya konulmuş (308). GSH-PO'nun KY ile ilgili çalışmalarında farklı değişiklikler gösterdiği durumlar da olmuştur. Sağ ve sol ventrikülde ayrı ayrı glutatyon peroksidaz gen

ekspresyonu üzerine yapılan çalışmada glutatyon peroksidaz gen aktivitesinin her iki ventrikülde de KY tanısı olmayanlara göre anlamlı arttığı izlenmiştir (330). Başka bir çalışmada ise miyokard dokusunda GSH-PO gen aktivitesinin ve GSH-PO enzim aktivitesinin KY tanılı olan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olmasa da azaldığı tespit edilmiştir (249). Glutatyon peroksidazın KY ile ilgili çalışmalarında KY şiddetini gösteren evrelerle arasındaki ilişki ve KY tanısı olmayan hastalardaki enzim aktivite değişimleri ortaya konulmasına rağmen BNP ile korelasyonu gösteren yeterli çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda BNP ile eritrosit GSH-PO enzim aktivitesi arasında pozitif yönde anlamlı olmayan ilişki bulundu. Buna zıt olarak BNP ile plazma GSH-PO aktivitesi arasında negatif yönde anlamlı olmayan ilişki ($p>0,05$, r_s : 0,20) bulundu.

KAT ve GSH-PO enzimleri hidrojen peroksidin zararsız moleküllere dönüştürülmesinde görevli esas antioksidan savunma sistemleridir. KAT aktivitesinin miyokard infarktüsü ve KY vakalarında azaldığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (327, 328). KY hastalarında NYHA evreleri arttıkça KAT düzeylerinin azaldığı da izlenmiştir. Ama evreler arası artışlar aynı çalışmada tam olarak anlamlı bulunmamıştır (328). KAT enzim aktivitesi ile BNP'nin ilişkisini gösteren literatür çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamızda eritrosit KAT aktivitesi BNP ile anlamlı ilişki göstermedi ($p>0,05$). Eritrosit KAT aktivitesinin diğer bir antioksidan enzim olan eritrosit GSH-PO enzimi ile aynı yönde anlamlı ilişkisi olduğu bulundu ($p<0,001$, r_s : 0,38).

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY hastalarında BNP'nin yerine proadrenomedüllin ve kopeptin belirteçlerinin kullanılmasının uygun olmadığını göstermektedir. Oksidan/antioksidan sistem açısından, düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY hastalarında BNP molekülünün eritrositlerde süperoksit dismutaz enzim aktivitesini artırarak ve ksantin oksidaz enzim aktivitesini azaltarak oksidan hasara karşı koruyucu rol oynadığı söylenebilir. Buna ek olarak, KY gelişimi ve komplikasyonlarının takibi açısından eritrosit süperoksit dismutaz ve ksantin oksidaz enzim aktivitelerinin BNP ile birlikte değerlendirilmesi klinik kullanımda yararlı olabileceği düşünülebilir. Bu çalışma, düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY hastalarının etiyolojisinde yer alan hastalıklardan meydana gelen gruplar oluşturularak proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidan/antioksidan sistem belirteçlerinin, bu hastaların takibinde gelişen klinik olayları öngörmede veya tespit etmedeki yerlerini belirleyecek daha ileri çalışmalara yol gösterici niteliktedir.

6. SONUÇLAR

1. Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarında serum kopeptin ve adrenomedüllin düzeyleri arasında pozitif yönde kuvvetli ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bulgular bu iki glikopeptidin klinik takipte birbirleri yerine kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, bu iki molekülün serum düzeyleri ile plazma BNP düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu çalışma sonuçları, bu iki belirtecin düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarında BNP yerine kullanılma potansiyeline sahip olmadıklarına işaret etmektedir.

2. Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarında plazma BNP düzeyi ile eritrosit süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ile pozitif ve BNP ile eritrosit ksantin oksidaz enzim aktivitesi arasında negatif yönde ve anlamlı ilişki bulunmuştur. Ancak, eritrosit MDA düzeyi ile plazma BNP düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu bulgulara göre BNP molekülünün eritrositlerde süperoksit dismutaz enzim aktivitesini artırarak ve ksantin oksidaz enzim aktivitesini azaltarak oksidan hasara karşı koruyucu rol oynadığı düşünülebilir. Bu çalışmanın sonucunda düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarında eritrositlerde BNP aracılı enzimatik antioksidan savunmanın lipid peroksidasyonuna engel olduğu söylenebilir.

3. Yukarıda belirtildiği gibi BNP, eritrosit süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ile pozitif yönde, eritrosit ksantin oksidaz enzim aktivitesi ile negatif yönde anlamlı korelasyon göstermiştir. Kalp yetmezliği gelişimi ve komplikasyonlarının takibi açısından antioksidan savunma göstergesi olarak eritrosit süperoksit dismutaz ve oksidatif stres göstergesi olarak eritrosit ksantin oksidaz enzim aktivitelerinin BNP ile beraber değerlendirilmesi klinik kullanımda faydalı olabilir.

ÖZET

DÜŞÜK EJEKSİYON FRAKSİYONLU KALP YETMEZLİĞİ HASTALARININ KANLARINDA BNP İLE PROADRENOMEDÜLLİN, KOPEPTİN VE OKSİDATİF STRES ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği (KY) hastalarında BNP ile proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidan/antioksidan sistem belirteçleri arasındaki ilişkinin araştırılması ve bu belirteçlerin tanıda veya takipte kullanılıp kullanılamayacağını ortaya konması amaçlandı.

Bu amaçla çalışmaya 18 yaşından büyük, 1 yıldan fazla süreyle kalp yetmezliği tanısı olan, Eylül 2016-Mayıs 2017 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji kliniğinde ayaktan veya yatarak takip edilen 72 hasta dahil edildi. Hastalardan aynı gün içerisinde BNP, proadrenomedüllin, kopeptin, eritrosit ve plazma oksidan/antioksidan sistem belirteçleri için uygun kan örnekleri alındı. İnsan plazma örneklerindeki BNP düzeyleri kemiluminesan mikropartikül immunolojik analiz yöntemiyle, serum proadrenomedüllin ve kopeptin düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Eritrosit ve plazma oksidan/antioksidan sistem belirteçleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçüldü.

Plazma BNP düzeyinin, serum proadrenomedüllin ve kopeptin düzeyleri ile pozitif yönde ama istatistiksel olarak anlamlı olmayan zayıf korelasyon gösterdiği bulundu. BNP konsantrasyonları eritrosit süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ile pozitif ($r=0,31$; $p=0,009$), eritrosit ksantin oksidaz aktivitesi ile negatif yönde anlamlı korelasyon ($r=-0,25$; $p=0,03$) gösterdi. BNP ile diğer oksidan/antioksidan sistem belirteçleri arasında anlamlı korelasyon saptanmadı. Serum proadrenomedüllin ve kopeptin düzeyleri arasında ise yüksek oranda anlamlı korelasyon bulundu.

Sonuç olarak, düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY hastalarında BNP'nin yerine proadrenomedüllin ve kopeptin belirteçlerinin kullanılması uygun bulunmamıştır. Düşük ejeksiyon fraksiyonlu KY hastalarında BNP molekülünün eritrositlerde süperoksit dismutaz enzim aktivitesini artırarak ve ksantin oksidaz enzim aktivitesini azaltarak oksidan hasara karşı koruyucu rol oynadığı düşünülebilir. Buna ek olarak, KY ve komplikasyonlarının takibi açısından eritrosit süperoksit dismutaz ve ksantin oksidaz enzim aktivitelerinin BNP ile birlikte değerlendirilmesi klinik kullanımda faydalı olabilir.

Anahtar Sözcükler: BNP, kalp yetmezliği, kopeptin, oksidatif stres, proadrenomedüllin

SUMMARY

INVESTIGATION OF RELATION BETWEEN BNP AND PROADRENOMEDULLIN, COPEPTIN AND OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD FROM PATIENTS WHO HAVE HEART FAILURE WITH REDUCED EJECTION FRACTION

The aim of the study was to investigate the relationship between BNP and proadrenomedullin, copeptin and oxidant/antioxidant system markers in the patients diagnosed with reduced ejection fraction heart failure (REF-HF). It was also aimed to determine whether these markers can be used in the diagnosis or follow-up of the disease.

For this aim, 72 patients older than 18 years old were included in the study. They were diagnosed with REF-HF for more than 1 year, followed at Ankara University cardiology clinics as inpatient or outpatient from September 2016 to May 2017. Suitable blood samples for BNP, proadrenomedullin, copeptin, erythrocyte and plasma oxidant/antioxidant system markers were taken from the patients on the same day. Plasma BNP levels were measured by chemiluminescence method, serum proadrenomedullin and copeptin levels were measured by ELISA methods. Erythrocyte and plasma oxidant/antioxidant system markers were measured by using spectrophotometric methods.

It was found that BNP showed insignificant positive weak correlation with proadrenomedullin and copeptin. On the other hand, we found that BNP was significantly positively correlated with erythrocyte superoxide dismutase (SOD) enzyme activity ($r=0.31$; $p=0.009$) and significantly negatively correlated with erythrocyte xanthine oxidase (XO) enzyme activity ($r=-0.25$; $p=0.03$). BNP was not significantly correlated with other oxidant/antioxidant system markers. However, there was highly significant positive correlation between proadrenomedullin and copeptin.

In conclusion, it is not suitable to use serum proadrenomedullin and copeptin values instead of plasma BNP value in diagnosis or follow-up of patients with REF-HF. It may be suggested that BNP can play a protection role against oxidant injury by increasing erythrocyte SOD activity and decreasing erythrocyte XO activity in patients diagnosed with REF-HF. Additionally, it may be useful to combine erythrocyte SOD and XO enzyme activities together with plasma BNP in monitoring of patients with REF-HF and its complications.

Key Words: BNP, copeptin, heart failure, oxidative stress, proadrenomedullin

KAYNAKLAR

1. Degertekin M, Erol C, Ergene O TL, Aksoy M, Erol Mk, Eren M., Sahin M, Eroglu E, Mutlu B, et al. [Heart failure prevalence and predictors in Turkey: HAPPY study]. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2012;40(4)(1016-5169 (Print)):298-308.
2. Bui AL, Horwich Tb, GC F. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2011;8(1)(1759-5010 (Electronic)):30-41.
3. Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, Bluemke DA, Butler J, Fonarow GC, et al. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail.* 2013;6(3):606-19.
4. Davis RC, Hobbs FD, Lip GY. ABC of heart failure. History and epidemiology. *BMJ.* 2000;320(7226):39-42.
5. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail.* 2008;10(10):933-89.
6. Sudharshana Murthy KA, Ashoka HG, Aparna AN. Evaluation and comparison of biomarkers in heart failure. *Indian Heart J.* 2016;68 Suppl 1:S22-8.
7. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med.* 2008;358(20):2148-59.
8. Bozkurt B, Mann DL. Use of biomarkers in the management of heart failure: are we there yet? *Circulation.* 2003;107(9):1231-3.
9. Benedict CR, Francis GS, Shelton B, Johnstone DE, Kubo SH, Kirlin P, et al. Effect of long-term enalapril therapy on neurohormones in patients with left ventricular dysfunction. SOLVD Investigators. *Am J Cardiol.* 1995;75(16):1151-7.
10. Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, Macmahon S, Ikram H, Sharpe N, et al. Neurohumoral prediction of benefit from carvedilol in ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *Circulation.* 1999;99(6):786-92.
11. McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, et al. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation.* 1999;100(10):1056-64.
12. Mallick A, Januzzi JL, Jr. Biomarkers in acute heart failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2015;68(6):514-25.

13. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(16):e147-239.
14. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2012;33(14):1787-847.
15. Heart Failure Society of A, Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, Collins SP, Ezekowitz JA, et al. HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J Card Fail*. 2010;16(6):e1-194.
16. Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Adrenomedullin and PAMP: discovery, structures, and cardiovascular functions. *Microsc Res Tech*. 2002;57(1):3-13.
17. Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Ishimitsu T, Eto T, Kangawa K, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26(6):1424-31.
18. Maisel A, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, Landsberg JW, Ponikowski P, et al. Mid-region pro-hormone markers for diagnosis and prognosis in acute dyspnea: results from the BACH (Biomarkers in Acute Heart Failure) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(19):2062-76.
19. Hokamaki J, Kawano H, Yoshimura M, Soejima H, Miyamoto S, Kajiwarai I, et al. Urinary biopyrrins levels are elevated in relation to severity of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(10):1880-5.
20. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(6):1352-6.
21. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂α in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation*. 1998;97(16):1536-9.
22. Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J*. 1998;135(1):115-20.
23. Watanabe E, Matsuda N, Shiga T, Kajimoto K, Ajiro Y, Kawarai H, et al. Significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*. 2006;12(7):527-32.
24. Gegenhuber A, Struck J, Dieplinger B, Poelz W, Pacher R, Morgenthaler NG, et al. Comparative evaluation of B-type natriuretic peptide, mid-regional pro-A-type natriuretic peptide, mid-regional pro-adrenomedullin, and Copeptin to predict 1-year mortality in patients with acute destabilized heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2007;13(1):42-9.

25. Gegenhuber A, Struck J, Dieplinger B, Poelz W, Pacher R, Morgenthaler NG, et al. Comparative evaluation of B-type natriuretic peptide, mid-regional pro-A-type natriuretic peptide, mid-regional pro-adrenomedullin, and Copeptin to predict 1-year mortality in patients with acute destabilized heart failure. *J Card Fail.* 2007;13(1):42-9.
26. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014;129(3):e28-e292.
27. Seferovic PM, Stoerk S, Filippatos G, Mareev V, Kavoliuniene A, Ristic AD, et al. Organization of heart failure management in European Society of Cardiology member countries: survey of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology in collaboration with the Heart Failure National Societies/Working Groups. *Eur J Heart Fail.* 2013;15(9):947-59.
28. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2015;131(4):e29-322.
29. Askoxylakis V, Thieke C, Pleger ST, Most P, Tanner J, Lindel K, et al. Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: a systematic review. *BMC Cancer.* 2010;10:105.
30. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2001;3(3):315-22.
31. Maggioni AP, Dahlstrom U, Filippatos G, Chioncel O, Crespo Leiro M, Drozd J, et al. EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur J Heart Fail.* 2013;15(7):808-17.
32. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2002;106(24):3068-72.
33. Khatibzadeh S, Farzadfar F, Oliver J, Ezzati M, Moran A. Worldwide risk factors for heart failure: a systematic review and pooled analysis. *Int J Cardiol.* 2013;168(2):1186-94.
34. Baena-Diez JM, Byram AO, Grau M, Gomez-Fernandez C, Vidal-Solsona M, Ledesma-Ulloa G, et al. Obesity is an independent risk factor for heart failure: Zona Franca Cohort study. *Clin Cardiol.* 2010;33(12):760-4.
35. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(8):891-975.
36. Heo S, Lennie TA, Okoli C, Moser DK. Quality of life in patients with heart failure: ask the patients. *Heart Lung.* 2009;38(2):100-8.

37. Komajda M, Follath F, Swedberg K, Cleland J, Aguilar JC, Cohen-Solal A, et al. The EuroHeart Failure Survey programme--a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 2: treatment. *Eur Heart J*. 2003;24(5):464-74.
38. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347(18):1397-402.
39. Yancy CW. Heart failure in African Americans. *Am J Cardiol*. 2005;96(7B):3i-12i.
40. Cohen-Solal A, McMurray JJ, Swedberg K, Pfeffer MA, Puu M, Solomon SD, et al. Benefits and safety of candesartan treatment in heart failure are independent of age: insights from the Candesartan in Heart failure--Assessment of Reduction in Mortality and morbidity programme. *Eur Heart J*. 2008;29(24):3022-8.
41. Frazier CG, Alexander KP, Newby LK, Anderson S, Iverson E, Packer M, et al. Associations of gender and etiology with outcomes in heart failure with systolic dysfunction: a pooled analysis of 5 randomized control trials. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(13):1450-8.
42. Komajda M, Anker SD, Charlesworth A, Okonko D, Metra M, Di Lenarda A, et al. The impact of new onset anaemia on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from COMET. *Eur Heart J*. 2006;27(12):1440-6.
43. Hillege HL, Girbes AR, de Kam PJ, Boomsma F, de Zeeuw D, Charlesworth A, et al. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000;102(2):203-10.
44. von Haehling S, Lainscak M, Springer J, Anker SD. Cardiac cachexia: a systematic overview. *Pharmacol Ther*. 2009;121(3):227-52.
45. Levy WC, Linker DT. Prediction of mortality in patients with heart failure and systolic dysfunction. *Curr Cardiol Rep*. 2008;10(3):198-205.
46. Curtis JP, Sokol SI, Wang Y, Rathore SS, Ko DT, Jadbabaie F, et al. The association of left ventricular ejection fraction, mortality, and cause of death in stable outpatients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(4):736-42.
47. Rosenzweig A, Seidman CE. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem* 1991;60(0066-4154 (Print)):229-55.
48. Saito Y. Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *J Cardiol*. 2010;56(3):262-70.
49. Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg*. 1956;14(2-3):99-112.
50. De Bold AJ. Heart atria granularity effects of changes in water-electrolyte balance. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1979;161(4):508-11.
51. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;118(1):131-9.

52. de Bold AJ, Flynn TG. Cardionatrin I - a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Life Sci.* 1983;33(3):297-302.
53. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;168(2):863-70.
54. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature.* 1988;332(6159):78-81.
55. Maisel AS, McCord J, Nowak RM, Hollander JE, Wu AH, Duc P, et al. Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(11):2010-7.
56. Maisel A, Hollander JE, Guss D, McCullough P, Nowak R, Green G, et al. Primary results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT). A multicenter study of B-type natriuretic peptide levels, emergency department decision making, and outcomes in patients presenting with shortness of breath. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(6):1328-33.
57. Cheng V, Kazanagra R, Garcia A, Lenert L, Krishnaswamy P, Gardetto N, et al. A rapid bedside test for B-type peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(2):386-91.
58. McLellan J, Heneghan CJ, Perera R, Clements AM, Glasziou PP, Kearley KE, et al. B-type natriuretic peptide-guided treatment for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;12:CD008966.
59. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192(2):553-60.
60. Kapas S, Martinez A, Cuttitta F, Hinson JP. Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal zona glomerulosa. *J Endocrinol.* 1998;156(3):477-84.
61. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem.* 2005;51(10):1823-9.
62. Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, et al. Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203(1):631-9.
63. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev.* 2000;21(2):138-67.
64. Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, Kowalak JA, Bengoechea JA, Zipfel PF, et al. Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners. *J Biol Chem.* 2001;276(15):12292-300.
65. Hirayama N, Kitamura K, Imamura T, Kato J, Koiwaya Y, Eto T. Secretion and clearance of the mature form of adrenomedullin in humans. *Life Sci.* 1999;64(26):2505-9.

66. Minamino N, Kikumoto K, Isumi Y. Regulation of adrenomedullin expression and release. *Microsc Res Tech.* 2002;57(1):28-39.
67. Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, Sato Y, Sumiyoshi A, Asada Y. Adrenomedullin augments the release and production of tissue factor pathway inhibitor in human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2003;57(1):232-7.
68. Vesely DL, Blankenship M, Douglass MA, McCormick MT, Rodriguez-Paz G, Schocken DD. Atrial natriuretic peptide increases adrenomedullin in the circulation of healthy humans. *Life Sci.* 1996;59(3):243-54.
69. Lainchbury JG, Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of short-term adrenomedullin infusion in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(3):1016-20.
70. Charles CJ, Lainchbury JG, Nicholls MG, Rademaker MT, Richards AM, Troughton RW. Adrenomedullin and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Regul Pept.* 2003;112(1-3):41-9.
71. Autelitano DJ, Ridings R, Pipolo L, Thomas WG. Adrenomedullin inhibits angiotensin AT1A receptor expression and function in cardiac fibroblasts. *Regul Pept.* 2003;112(1-3):131-7.
72. Shan J, Stachniak T, Jhamandas JH, Krukoff TL. Autonomic and neuroendocrine actions of adrenomedullin in the brain: mechanisms for homeostasis. *Regul Pept.* 2003;112(1-3):33-40.
73. Tomoda Y, Kikumoto K, Isumi Y, Katafuchi T, Tanaka A, Kangawa K, et al. Cardiac fibroblasts are major production and target cells of adrenomedullin in the heart in vitro. *Cardiovasc Res.* 2001;49(4):721-30.
74. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Nagaya N, Matsuo H, Takishita S, et al. Production and secretion of adrenomedullin in cultured rat cardiac myocytes and nonmyocytes: stimulation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology.* 1998;139(11):4576-80.
75. Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, Imamura T, Koiwaya Y, Kangawa K, et al. Enhanced adrenomedullin production by mechanical stretching in cultured rat cardiomyocytes. *Hypertension.* 2000;35(6):1210-4.
76. von der Hardt K, Kandler MA, Popp K, Schoof E, Chada M, Rascher W, et al. Aerosolized adrenomedullin suppresses pulmonary transforming growth factor-beta1 and interleukin-1 beta gene expression in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2002;457(1):71-6.
77. Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Murakami H, Sasano H, Shirato K, et al. Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin Sci (Lond).* 1999;97(2):247-51.
78. Minami K, Segawa K, Uezono Y, Shiga Y, Shiraishi M, Ogata J, et al. Adrenomedullin inhibits the pressor effects and decrease in renal blood flow induced by norepinephrine or angiotensin II in anesthetized rats. *Jpn J Pharmacol.* 2001;86(2):159-64.
79. Hayashi M, Shimomura T, Fujita T. Hyperglycemia increases vascular adrenomedullin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258(2):453-6.

80. Hague S, Zhang L, Oehler MK, Manek S, MacKenzie IZ, Bicknell R, et al. Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density. *Clin Cancer Res.* 2000;6(7):2808-14.
81. Nishikimi T, Kitamura K, Saito Y, Shimada K, Ishimitsu T, Takamiya M, et al. Clinical studies on the sites of production and clearance of circulating adrenomedullin in human subjects. *Hypertension.* 1994;24(5):600-4.
82. Choksi T, Hay DL, Legon S, Poyner DR, Hagner S, Bloom SR, et al. Comparison of the expression of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) with CGRP and adrenomedullin binding in cell lines. *Br J Pharmacol.* 2002;136(5):784-92.
83. Hay DL, Smith DM. Adrenomedullin receptors: molecular identity and function. *Peptides.* 2001;22(11):1753-63.
84. Morfis M, Christopoulos A, Sexton PM. RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(11):596-601.
85. Chakravarty P, Suthar TP, Coppock HA, Nicholl CG, Bloom SR, Legon S, et al. CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol.* 2000;130(1):189-95.
86. Fung E, Fiscus RR. Adrenomedullin induces direct (endothelium-independent) vasorelaxations and cyclic adenosine monophosphate elevations that are synergistically enhanced by brain natriuretic peptide in isolated rings of rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41(6):849-55.
87. Terata K, Miura H, Liu Y, Loberiza F, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K(+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(6):H2620-6.
88. Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama N, Satonaka H, Walsh K, et al. Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res.* 2001;89(1):63-70.
89. De Matteo R, May CN. Direct coronary vasodilator action of adrenomedullin is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 2003;140(8):1414-20.
90. Zhang XP, Tada H, Wang Z, Hintze TH. cAMP signal transduction, a potential compensatory pathway for coronary endothelial NO production after heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(8):1273-8.
91. Kato K, Yin H, Agata J, Yoshida H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(4):H1506-14.
92. Kim W, Moon SO, Sung MJ, Kim SH, Lee S, So JN, et al. Angiogenic role of adrenomedullin through activation of Akt, mitogen-activated protein kinase, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *FASEB J.* 2003;17(13):1937-9.

93. Del Bene R, Lazzeri C, Barletta G, Vecchiarino S, Guerra CT, Franchi F, et al. Effects of low-dose adrenomedullin on cardiac function and systemic haemodynamics in man. *Clin Physiol*. 2000;20(6):457-65.
94. Kano H, Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Horio T, Ikeda M, et al. Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 1996;14(2):209-13.
95. Wolf K, Kurtz A, Pfeifer M, Hocherl K, Riegger GA, Kramer BK. Different regulation of left ventricular ANP, BNP and adrenomedullin mRNA in the two-kidney, one-clip model of renovascular hypertension. *Pflugers Arch*. 2001;442(2):212-7.
96. Nakamura R, Kato J, Kitamura K, Onitsuka H, Imamura T, Marutsuka K, et al. Beneficial effects of adrenomedullin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res*. 2002;56(3):373-80.
97. Mukherjee R, Multani MM, Sample JA, Dowdy KB, Zellner JL, Hoover DB, et al. Effects of adrenomedullin on human myocyte contractile function and beta-adrenergic response. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2002;7(4):235-40.
98. Eto T, Kato J, Kitamura K. Regulation of production and secretion of adrenomedullin in the cardiovascular system. *Regul Pept*. 2003;112(1-3):61-9.
99. Luodonpaa M, Rysa J, Pikkarainen S, Tenhunen O, Tokola H, Puhakka J, et al. Mechanisms regulating adrenomedullin gene expression in the left ventricle: role of mechanical load. *Regul Pept*. 2003;112(1-3):153-9.
100. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Yoshitomi Y, Miyao Y, Miyazaki S, et al. Plasma adrenomedullin as an indicator of prognosis after acute myocardial infarction. *Heart*. 1999;81(5):483-7.
101. Nicholls MG, Lainchbury JG, Lewis LK, McGregor DO, Richards AM, Troughton RW, et al. Bioactivity of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in man. *Peptides*. 2001;22(11):1745-52.
102. Kojima H, Tsujimoto T, Uemura M, Takaya A, Okamoto S, Ueda S, et al. Significance of increased plasma adrenomedullin concentration in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 1998;28(5):840-6.
103. Guevara M, Gines P, Jimenez W, Sort P, Fernandez-Esparrach G, Escorsell A, et al. Increased adrenomedullin levels in cirrhosis: relationship with hemodynamic abnormalities and vasoconstrictor systems. *Gastroenterology*. 1998;114(2):336-43.
104. Fabrega E, Casafont F, Crespo J, de la Pena J, San Miguel G, de las Heras G, et al. Plasma adrenomedullin levels in patients with hepatic cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 1997;92(10):1901-4.
105. Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, Washimine H, Ichiki Y, Kawamoto M, et al. Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett*. 1994;351(1):35-7.

106. Tanaka M, Kitamura K, Ishizaka Y, Ishiyama Y, Kato J, Kangawa K, et al. Plasma adrenomedullin in various diseases and exercise-induced change in adrenomedullin in healthy subjects. *Intern Med.* 1995;34(8):728-33.
107. Song LW, Ma XM, Wei YJ, Tang J, Zhang BJ, Wang TL. [Observation on hypotensive action of adrenomedullin and its distribution in tissues]. *Sheng Li Xue Bao.* 1995;47(4):408-11.
108. Yamamoto K, Ikeda U, Sekiguchi H, Shimada K. Plasma levels of adrenomedullin in patients with mitral stenosis. *Am Heart J.* 1998;135(3):542-9.
109. Kohno M, Hanehira T, Kano H, Horio T, Yokokawa K, Ikeda M, et al. Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. *Hypertension.* 1996;27(1):102-7.
110. Miyao Y, Nishikimi T, Goto Y, Miyazaki S, Daikoku S, Morii I, et al. Increased plasma adrenomedullin levels in patients with acute myocardial infarction in proportion to the clinical severity. *Heart.* 1998;79(1):39-44.
111. Kobayashi K, Kitamura K, Hirayama N, Date H, Kashiwagi T, Ikushima I, et al. Increased plasma adrenomedullin in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1996;131(4):676-80.
112. Kuwasako K, Kida O, Kitamura K, Kato J, Eto T. Plasma adrenomedullin in cerebrovascular disease: a possible indicator of endothelial injury. *Int Angiol.* 1997;16(4):272-9.
113. Jougasaki M, Rodeheffer RJ, Redfield MM, Yamamoto K, Wei CM, McKinley LJ, et al. Cardiac secretion of adrenomedullin in human heart failure. *J Clin Invest.* 1996;97(10):2370-6.
114. Di Iorio R, Marinoni E, Letizia C, Alo P, Villaccio B, Cosmi EV. Adrenomedullin, a new vasoactive peptide, is increased in preeclampsia. *Hypertension.* 1998;32(4):758-63.
115. Ehlenz K, Koch B, Preuss P, Simon B, Koop I, Lang RE. High levels of circulating adrenomedullin in severe illness: correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1997;105(3):156-62.
116. Kakishita M, Nishikimi T, Okano Y, Satoh T, Kyotani S, Nagaya N, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Clin Sci (Lond).* 1999;96(1):33-9.
117. Kikumoto K, Kubo A, Hayashi Y, Minamino N, Inoue S, Dohi K, et al. Increased plasma concentration of adrenomedullin in patients with subarachnoid hemorrhage. *Anesth Analg.* 1998;87(4):859-63.
118. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocrine Reviews.* 2000;21(2):138-67.
119. Chow SL, Maisel AS, Anand I, Bozkurt B, de Boer RA, Felker GM, et al. Role of Biomarkers for the Prevention, Assessment, and Management of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2017;135(22):e1054-e91.
120. Daggubati S, Parks JR, Overton RM, Cintron G, Schocken DD, Vesely DL. Adrenomedullin, endothelin, neuro peptide Y, atrial, brain, and C-natriuretic prohormone peptides compared as early heart failure indicators. *Cardiovasc Res.* 1997;36(2):246-55.

121. Acher R, Chauvet J. [The structure of bovine vasopressin]. *Biochim Biophys Acta*. 1953;12(3):487-8.
122. Acher R, Chauvet J, Rouille Y. Dynamic processing of neuropeptides: sequential conformation shaping of neurohypophysial preprohormones during intraneuronal secretory transport. *J Mol Neurosci*. 2002;18(3):223-8.
123. Land H, Grez M, Ruppert S, Schmale H, Rehbein M, Richter D, et al. Deduced amino acid sequence from the bovine oxytocin-neurophysin I precursor cDNA. *Nature*. 1983;302(5906):342-4.
124. Holwerda DA. A glycopeptide from the posterior lobe of pig pituitaries. I. Isolation and characterization. *Eur J Biochem*. 1972;28(3):334-9.
125. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem*. 2006;52(1):112-9.
126. Morgenthaler NG, Struck J, Jochberger S, Dunser MW. Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(2):43-9.
127. Szinnai G, Morgenthaler NG, Berneis K, Struck J, Muller B, Keller U, et al. Changes in plasma copeptin, the c-terminal portion of arginine vasopressin during water deprivation and excess in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(10):3973-8.
128. Roussel R, Fezeu L, Marre M, Velho G, Fumeron F, Jungers P, et al. Comparison Between Copeptin and Vasopressin in a Population From the Community and in People With Chronic Kidney Disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(12):4656-63.
129. Katan M, Morgenthaler N, Widmer I, Puder JJ, Konig C, Muller B, et al. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, correlates with the individual stress level. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29(3):341-6.
130. Nickel CH, Bingisser R, Morgenthaler NG. The role of copeptin as a diagnostic and prognostic biomarker for risk stratification in the emergency department. *BMC Med*. 2012;10:7.
131. Boertien WE, Meijer E, Zitterma D, van Dijk MA, Rabelink TJ, Breuning MH, et al. Copeptin, a surrogate marker for vasopressin, is associated with kidney function decline in subjects with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(11):4131-7.
132. Boertien WE, Meijer E, Li J, Bost JE, Struck J, Flessner MF, et al. Relationship of copeptin, a surrogate marker for arginine vasopressin, with change in total kidney volume and GFR decline in autosomal dominant polycystic kidney disease: results from the CRISP cohort. *Am J Kidney Dis*. 2013;61(3):420-9.
133. Dobsa L, Edozien KC. Copeptin and its potential role in diagnosis and prognosis of various diseases. *Biochem Med (Zagreb)*. 2013;23(2):172-90.
134. Zitterma D, van den Berg E, Meijer E, Boertien WE, Muller Kobold AC, Franssen CF, et al. Kidney function and plasma copeptin levels in healthy kidney donors and autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(9):1553-62.

135. Mockel M, Searle J. Copeptin-marker of acute myocardial infarction. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(7):421.
136. Hanaoka K, Guggino WB. cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(7):1179-87.
137. Reichlin T, Hochholzer W, Stelzig C, Laule K, Freidank H, Morgenthaler NG, et al. Incremental value of copeptin for rapid rule out of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(1):60-8.
138. Yalta K, Yalta T, Sivri N, Yetkin E. Copeptin and cardiovascular disease: a review of a novel neurohormone. *Int J Cardiol.* 2013;167(5):1750-9.
139. Lipinski MJ, Escarcega RO, D'Ascenzo F, Magalhaes MA, Baker NC, Torguson R, et al. A systematic review and collaborative meta-analysis to determine the incremental value of copeptin for rapid rule-out of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2014;113(9):1581-91.
140. Mockel M, Searle J, Hamm C, Slagman A, Blankenberg S, Huber K, et al. Early discharge using single cardiac troponin and copeptin testing in patients with suspected acute coronary syndrome (ACS): a randomized, controlled clinical process study. *Eur Heart J.* 2015;36(6):369-76.
141. Alehagen U, Dahlstrom U, Rehfeld JF, Goetze JP. Association of copeptin and N-terminal proBNP concentrations with risk of cardiovascular death in older patients with symptoms of heart failure. *JAMA.* 2011;305(20):2088-95.
142. Neuhold S, Huelsmann M, Strunk G, Stoiser B, Struck J, Morgenthaler NG, et al. Comparison of copeptin, B-type natriuretic peptide, and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure: prediction of death at different stages of the disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(4):266-72.
143. Stoiser B, Mortl D, Hulsman M, Berger R, Struck J, Morgenthaler NG, et al. Copeptin, a fragment of the vasopressin precursor, as a novel predictor of outcome in heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2006;36(11):771-8.
144. Voors AA, von Haehling S, Anker SD, Hillege HL, Struck J, Hartmann O, et al. C-terminal provasopressin (copeptin) is a strong prognostic marker in patients with heart failure after an acute myocardial infarction: results from the OPTIMAAL study. *Eur Heart J.* 2009;30(10):1187-94.
145. Li X, Yang XC, Sun QM, Chen XD, Li YC. Brain natriuretic peptide and copeptin levels are associated with cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Chin Med J (Engl).* 2013;126(5):823-7.
146. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Fifth edition. ed. Oxford, United Kingdom :: Oxford University Press; 2015. xxxviii, 905 pages p.
147. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell.* 2002;1(2):117-23.
148. Akpoyraz M, Durak I. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası.* 1995;48:253-62.

149. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 1989;70(6):737-57.
150. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(1):24-38.
151. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism.* 2000;49(2 Suppl 1):27-9.
152. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP. The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors.* 1999;10(2-3):157-67.
153. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine.* 2000;108(8):652-9.
154. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011;283(2-3):65-87.
155. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22546-54.
156. Ochoa L, Waypa G, Mahoney JR, Jr., Rodriguez L, Minnear FL. Contrasting effects of hypochlorous acid and hydrogen peroxide on endothelial permeability: prevention with cAMP drugs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(4 Pt 1):1247-55.
157. Sugamura K, Keaney JF, Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):978-92.
158. Lieberman M, Marks AD, Smith CM. Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2009. x, 1011 p. p.
159. Kopani M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biro C. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin Chim Acta.* 2006;364(1-2):61-6.
160. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:152786.
161. Gürdöl F, Ademoğlu E. *Biyokimya.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2010. 647-52 p.
162. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41(12 Pt 2):1819-28.
163. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
164. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987;25(4):317-64.
165. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(9):1482-95.
166. Rao RS, Moller IM. Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics.* 2011;11(21):4166-73.

167. Prokai L, Yan LJ, Vera-Serrano JL, Stevens SM, Jr., Forster MJ. Mass spectrometry-based survey of age-associated protein carbonylation in rat brain mitochondria. *J Mass Spectrom.* 2007;42(12):1583-9.
168. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329(1-2):23-38.
169. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(6):1033-77.
170. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* 1999;300:156-66.
171. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298-300.
172. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59(3):527-605.
173. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, et al. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem.* 2006;281(44):33789-801.
174. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995;11(4):376-81.
175. Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M, et al. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2006;113(14):1779-86.
176. Chen K, Craige SE, Keaney JF, Jr. Downstream targets and intracellular compartmentalization in Nox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(10):2467-80.
177. Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, Cave AC, et al. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension.* 2008;51(2):319-25.
178. Bell RM, Cave AC, Johar S, Hearse DJ, Shah AM, Shattock MJ. Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning. *FASEB J.* 2005;19(14):2037-9.
179. Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J.* 2006;20(9):1546-8.
180. Chen Z, Keaney JF, Jr., Schulz E, Levison B, Shan L, Sakuma M, et al. Decreased neointimal formation in Nox2-deficient mice reveals a direct role for NADPH oxidase in the response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(35):13014-9.

181. Thomas M, Gavrilu D, McCormick ML, Miller FJ, Jr., Daugherty A, Cassis LA, et al. Deletion of p47phox attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2006;114(5):404-13.
182. Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, et al. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(1):H24-32.
183. Vendrov AE, Hakim ZS, Madamanchi NR, Rojas M, Madamanchi C, Runge MS. Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(12):2714-21.
184. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, et al. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE^(-/-) mice. *J Clin Invest*. 2001;108(10):1513-22.
185. Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*. 1981;25(1):67-82.
186. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*. 2002;33(6):774-97.
187. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312(3):159-63.
188. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. 1981;81(1):22-9.
189. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1986;548:47-63.
190. Ohtsubo T, Rovira II, Starost MF, Liu C, Finkel T. Xanthine oxidoreductase is an endogenous regulator of cyclooxygenase-2. *Circ Res*. 2004;95(11):1118-24.
191. Schroder K, Vecchione C, Jung O, Schreiber JG, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, et al. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(9):1353-60.
192. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev*. 2006;58(1):87-114.
193. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357(Pt 3):593-615.
194. Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Current pharmaceutical design*. 2014;20(22):3548-53.
195. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103(9):1282-8.

196. Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2009;30(9):1142-50.
197. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105(14):1656-62.
198. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;97(3):237-41.
199. Study of the Effectiveness of Additional Reductions in C, Homocysteine Collaborative G, Armitage JM, Bowman L, Clarke RJ, Wallendszus K, et al. Effects of homocysteine-lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. *JAMA*. 2010;303(24):2486-94.
200. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, et al. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2001;104(11):1286-91.
201. Ichinose F, Bloch KD, Wu JC, Hataishi R, Aretz HT, Picard MH, et al. Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(3):H1070-5.
202. Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2001;103(25):3099-104.
203. Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, et al. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of Immunology*. 2000;165(6):3430-5.
204. Miyoshi T, Li Y, Shih DM, Wang X, Laubach VE, Matsumoto AH, et al. Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life sciences*. 2006;79(6):525-31.
205. Feng Q, Lu X, Jones DL, Shen J, Arnold JM. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2001;104(6):700-4.
206. Zhang P, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y. Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res*. 2007;100(7):1089-98.

207. Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, et al. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest*. 2002;109(6):735-43.
208. Gunnett CA, Lund DD, McDowell AK, Faraci FM, Heistad DD. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1617-22.
209. Saraiva RM, Minhas KM, Raju SV, Barouch LA, Pitz E, Schuleri KH, et al. Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium. *Circulation*. 2005;112(22):3415-22.
210. Dawson D, Lygate CA, Zhang MH, Hulbert K, Neubauer S, Casadei B. nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation*. 2005;112(24):3729-37.
211. Nauseef WM, Malech HL. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood*. 1986;67(5):1504-7.
212. Nauseef WM. Myeloperoxidase biosynthesis by a human promyelocytic leukemia cell line: insight into myeloperoxidase deficiency. *Blood*. 1986;67(4):865-72.
213. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1994;94(1):437-44.
214. Hazell LJ, Arnold L, Flowers D, Waeg G, Malle E, Stocker R. Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1996;97(6):1535-44.
215. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem*. 2001;276(44):41279-87.
216. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-43.
217. Brennan ML, Anderson MM, Shih DM, Qu XD, Wang X, Mehta AC, et al. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest*. 2001;107(4):419-30.
218. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med*. 2007;13(10):1176-84.
219. McMillen TS, Heinecke JW, LeBoeuf RC. Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2005;111(21):2798-804.
220. Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol*. 2010;23(3):447-54.
221. Kenmoku S, Urano Y, Kojima H, Nagano T. Development of a highly specific rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis. *J Am Chem Soc*. 2007;129(23):7313-8.

222. Utsumi H, Yasukawa K, Soeda T, Yamada K, Shigemi R, Yao T, et al. Noninvasive mapping of reactive oxygen species by in vivo electron spin resonance spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317(1):228-35.
223. Utsumi H, Muto E, Masuda S, Hamada A. In vivo ESR measurement of free radicals in whole mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;172(3):1342-8.
224. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1605-13.
225. Vita JA, Keaney JF, Jr., Raby KE, Morrow JD, Freedman JE, Lynch S, et al. Low plasma ascorbic acid independently predicts the presence of an unstable coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(5):980-6.
226. Kono Y, Nakamura K, Kimura H, Nishii N, Watanabe A, Banba K, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circ J*. 2006;70(8):1001-5.
227. Nagayoshi Y, Kawano H, Hokamaki J, Miyamoto S, Kojima S, Shimomura H, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels increase after reperfusion in acute myocardial infarction and may predict subsequent cardiac events. *Am J Cardiol*. 2005;95(4):514-7.
228. Korantzopoulos P, Galaris D, Papaioannides D, Siogas K. The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention. *Med Sci Monit*. 2003;9(6):RA120-5.
229. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(4):379-88.
230. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(2):506-14.
231. Khaper N, Singal PK. Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(4):856-61.
232. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9782-7.
233. Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96(7):2414-20.
234. Dhalla AK, Singal PK. Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol*. 1994;266(4 Pt 2):H1280-5.
235. Vaage J, Antonelli M, Bufi M, Irtun O, DeBlasi RA, Corbucci GG, et al. Exogenous reactive oxygen species deplete the isolated rat heart of antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(1-2):85-92.
236. Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE. Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. *Cancer Res*. 1988;48(17):4766-9.

237. Zweier JL, Rayburn BK, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium. *J Clin Invest.* 1987;80(6):1728-34.
238. Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2004;109(4):544-9.
239. Minhas KM, Saraiva RM, Schuleri KH, Lehrke S, Zheng M, Saliaris AP, et al. Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Circulation research.* 2006;98(2):271-9.
240. Hamblin M, Smith HM, Hill MF. Dietary Supplementation With Vitamin E Ameliorates Cardiac Failure in Type I Diabetic Cardiomyopathy by Suppressing Myocardial Generation of 8-iso-Prostaglandin F 2 α and Oxidized Glutathione. *Journal of cardiac failure.* 2007;13(10):884-92.
241. Redout EM, van der Toorn A, Zuidwijk MJ, van de Kolk CW, van Echteld CJ, Musters RJ, et al. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2010;298(3):H1038-H47.
242. Sia YT, Parker TG, Liu P, Tsoporis JN, Adam A, Rouleau JL. Improved post-myocardial infarction survival with probucol in rats: effects on left ventricular function, morphology, cardiac oxidative stress and cytokine expression. *Journal of the American College of Cardiology.* 2002;39(1):148-56.
243. Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, et al. Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure. *Circulation.* 2002;106(3):362-7.
244. Qin F, Shite J, Liang C-s. Antioxidants attenuate myocyte apoptosis and improve cardiac function in CHF: association with changes in MAPK pathways. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2003;285(2):H822-H32.
245. Gross GJ, O'Rourke ST, Pelc LR, Warltier DC. Myocardial and endothelial dysfunction after multiple, brief coronary occlusions: role of oxygen radicals. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 1992;263(6):H1703-H9.
246. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, et al. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circulation Research.* 1989;65(3):607-22.
247. Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation.* 2000;102(17):2105-10.
248. Tsutsui T, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology.* 2002;39(6):957-62.

249. Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabae A, Bristow MR, et al. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *Journal of cardiac failure*. 2005;11(6):473-80.
250. Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, Sharma R, Francis D, Knosalla C, et al. Uric acid and survival in chronic heart failure. *Circulation*. 2003;107(15):1991-7.
251. Krishnan E. Hyperuricemia and incident heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009;2(6):556-62.
252. Ahmed MI, Gladden JD, Litovsky SH, Lloyd SG, Gupta H, Inusah S, et al. Increased oxidative stress and cardiomyocyte myofibrillar degeneration in patients with chronic isolated mitral regurgitation and ejection fraction > 60%. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(7):671-9.
253. Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi ZA, et al. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2001;104(20):2407-11.
254. George J, Carr E, Davies J, Belch JJ, Struthers A. High-dose allopurinol improves endothelial function by profoundly reducing vascular oxidative stress and not by lowering uric acid. *Circulation*. 2006;114(23):2508-16.
255. Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, Struthers AD. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation*. 2002;106(2):221-6.
256. Hare JM, Mangal B, Brown J, Fisher C, Jr., Freudenberger R, Colucci WS, et al. Impact of oxypurinol in patients with symptomatic heart failure. Results of the OPT-CHF study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(24):2301-9.
257. Calvieri C, Rubattu S, Volpe M. Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(1):5-13.
258. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(25):2357-68.
259. Kjaer A, Hesse B. Heart failure and neuroendocrine activation: diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives. *Clin Physiol*. 2001;21(6):661-72.
260. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med*. 1998;339(5):321-8.
261. Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Makita S, Niinuma H, Hiramori K. Vasodilatory effects of B-type natriuretic peptide are impaired in patients with chronic heart failure. *Am Heart J*. 1998;135(3):414-20.
262. Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, et al. Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest*. 1986;78(5):1362-74.
263. Sun T, Wang L, Zhang Y. Prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with chronic and advanced heart failure. *Intern Med J*. 2007;37(3):168-71.

264. Miller WL, Burnett JC, Jr., Hartman KA, Henle MP, Burritt MF, Jaffe AS. Lower rather than higher levels of B-type natriuretic peptides (NT-pro-BNP and BNP) predict short-term mortality in end-stage heart failure patients treated with nesiritide. *Am J Cardiol.* 2005;96(6):837-41.
265. Lourenco P, Ribeiro A, Pintalhao M, Cunha FM, Pereira J, Marques P, et al. Prognostic prediction in acute heart failure patients with extreme BNP values. *Biomarkers.* 2017;1-8.
266. Kobayashi K, Kitamura K, Etoh T, Nagatomo Y, Takenaga M, Ishikawa T, et al. Increased plasma adrenomedullin levels in chronic congestive heart failure. *Am Heart J.* 1996;131(5):994-8.
267. Masson S, Latini R, Carbonieri E, Moretti L, Rossi MG, Ciricugno S, et al. The predictive value of stable precursor fragments of vasoactive peptides in patients with chronic heart failure: data from the GISSI-heart failure (GISSI-HF) trial. *Eur J Heart Fail.* 2010;12(4):338-47.
268. Potocki M, Breidthardt T, Reichlin T, Hartwiger S, Morgenthaler NG, Bergmann A, et al. Comparison of midregional pro-atrial natriuretic peptide with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure. *J Intern Med.* 2010;267(1):119-29.
269. Funke-Kaiser A, Mann K, Colquhoun D, Zeller T, Hunt D, Simes J, et al. Midregional proadrenomedullin and its change predicts recurrent major coronary events and heart failure in stable coronary heart disease patients: the LIPID study. *International journal of cardiology.* 2014;172(2):411-8.
270. Giannitsis E, Katus HA. Cardiac troponin level elevations not related to acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10(11):623-34.
271. Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, Martina B, Schindler C, Buser P, et al. Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. *N Engl J Med.* 2004;350(7):647-54.
272. Moe GW, Howlett J, Januzzi JL, Zowall H. N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Testing Improves the Management of Patients With Suspected Acute Heart Failure. *Circulation.* 2007;115(24):3103-10.
273. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European journal of heart failure.* 2012;14(8):803-69.
274. Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2006;290(1):H17-H29.
275. Chen HH, Burnett Jr JC. Clinical application of the natriuretic peptides in heart failure. *European heart journal supplements.* 2006;8(suppl_E):E18-E25.
276. De Bold A, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life sciences.* 1981;28(1):89-94.
277. Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Simic D, Radovanovic S, Simic T. Novel Biomarkers of Heart Failure. *Adv Clin Chem.* 2017;79:93-152.

278. Bielli P, Calabrese L. Structure to function relationships in ceruloplasmin: a 'moonlighting' protein. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(9):1413-27.
279. Mukhopadhyay CK, Attieh ZK, Fox PL. Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science.* 1998;279(5351):714-7.
280. Shiva S, Wang X, Ringwood LA, Xu X, Yuditskaya S, Annavajjhala V, et al. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. *Nat Chem Biol.* 2006;2(9):486-93.
281. Sokolov AV, Ageeva KV, Pulina MO, Cherkalina OS, Samygina VR, Vlasova, II, et al. Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other. *Free Radic Res.* 2008;42(11-12):989-98.
282. Dadu RT, Dodge R, Nambi V, Virani SS, Hoogeveen RC, Smith NL, et al. Ceruloplasmin and heart failure in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circ Heart Fail.* 2013;6(5):936-43.
283. Saunders JT, Nambi V, de Lemos JA, Chambless LE, Virani SS, Boerwinkle E, et al. Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation.* 2011;123(13):1367-76.
284. Xu Y, Lin H, Zhou Y, Cheng G, Xu G. Ceruloplasmin and the extent of heart failure in ischemic and nonischemic cardiomyopathy patients. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:348145.
285. Cabassi A, Binno SM, Tedeschi S, Ruzicka V, Dancelli S, Rocco R, et al. Low serum ferroxidase I activity is associated with mortality in heart failure and related to both peroxynitrite-induced cysteine oxidation and tyrosine nitration of ceruloplasmin. *Circ Res.* 2014;114(11):1723-32.
286. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest.* 1997;99(9):2075-81.
287. Kettle AJ. Neutrophils convert tyrosyl residues in albumin to chlorotyrosine. *FEBS Lett.* 1996;379(1):103-6.
288. Tang WH, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, et al. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(24):2364-70.
289. Zhang R, Brennan M-L, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama.* 2001;286(17):2136-42.
290. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(20):1993-2000.
291. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S346-51.

292. Rudolph V, Rudolph TK, Hennings JC, Blankenberg S, Schnabel R, Steven D, et al. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;43(8):1189-96.
293. Tang WW, Brennan M-L, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, et al. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *The American journal of cardiology*. 2006;98(6):796-9.
294. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology international*. 1999;49(2):91-102.
295. Cutler RG. Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991;621(1):1-28.
296. Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 1998;71(5):2034-40.
297. Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(4):450-6.
298. Kono Y, Nakamura K, Kimura H, Nishii N, Watanabe A, Banba K, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circulation Journal*. 2006;70(8):1001-5.
299. Nimata M, Kishimoto C, Shioji K, Ishizaki K, Kitaguchi S, Hashimoto T, et al. Upregulation of redox-regulating protein, thioredoxin, in endomyocardial biopsy samples of patients with myocarditis and cardiomyopathies. *Molecular and cellular biochemistry*. 2003;248(1):193-6.
300. Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Wada Y, Okuda S, Nao T, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine reflects symptomatic status and severity of systolic dysfunction in patients with chronic heart failure. *European journal of heart failure*. 2011;13(1):29-36.
301. Szczurek W, Szygula-Jurkiewicz B. Oxidative stress and inflammatory markers—the future of heart failure diagnostics? *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska= Polish Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2015;12(2):145.
302. Susa T, Kobayashi S, Tanaka T, Murakami W, Akashi S, Kunitsugu I, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a novel biomarker for predicting cardiac events and evaluating the effectiveness of carvedilol treatment in patients with chronic systolic heart failure. *Circulation Journal*. 2012;76(1):117-26.
303. Nakamura H, Hoshino Y, Okuyama H, Matsuo Y, Yodoi J. Thioredoxin 1 delivery as new therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(4):303-9.
304. Ago T, Yeh I, Yamamoto M, Schinke-Braun M, Brown JA, Tian B, et al. Thioredoxin1 upregulates mitochondrial proteins related to oxidative phosphorylation and TCA cycle in the heart. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(9-10):1635-50.
305. Jekell A, Hossain A, Alehagen U, Dahlström U, Rosén A. Elevated circulating levels of thioredoxin and stress in chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2004;6(7):883-90.

306. Otaki Y, Watanabe T, Takahashi H, Kadowaki S, Narumi T, Honda Y, et al. Association of plasma thioredoxin-1 with renal tubular damage and cardiac prognosis in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiology*. 2014;64(5):353-9.
307. Polidori MC, Savino K, Alunni G, Freddio M, Senin U, Sies H, et al. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;32(2):148-52.
308. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;31(6):1352-6.
309. Castro PF, Díaz-Araya G, Nettle D, Corbalán R, Pérez O, Nazzari C, et al. Effects of early decrease in oxidative stress after medical therapy in patients with class IV congestive heart failure. *The American journal of cardiology*. 2002;89(2):236-9.
310. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovascular research*. 1998;40(3):426-32.
311. Radovanovic S, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Djukic T, Suvakov S, Krotin M, et al. Markers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities as predictors of morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2012;18(6):493-501.
312. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2002;106(24):3073-8.
313. Krupa W, Rozwodowska M, Sielski S, Czarnecka-Zaba E, Fabiszak T, Drewa G, et al. Influence of cardiac resynchronization therapy on oxidative stress markers in patients with chronic heart failure. *Cardiol J*. 2014;21(5):576-82.
314. Wojciechowska C, Romuk E, Tomasik A, Skrzep-Poloczek B, Nowalany-Kozielska E, Birkner E, et al. Oxidative stress markers and C-reactive protein are related to severity of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:147040.
315. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J*. 1993;14(11):1493-8.
316. Borges F, Fernandes E, Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 2002;9(2):195-217.
317. Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1999;79(8):967-74.
318. Vorbach C, Scriven A, Capecchi MR. The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes & development*. 2002;16(24):3223-35.

319. Huang H, Huang B, Li Y, Huang Y, Li J, Yao H, et al. Uric acid and risk of heart failure: a systematic review and meta-analysis. *European journal of heart failure*. 2014;16(1):15-24.
320. Adachi T, Fukushima T, Usami Y, Hirano K. Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochemical Journal*. 1993;289(2):523-7.
321. Vickers S, Schiller HJ, Hildreth JE, Bulkley GB. Immunoaffinity localization of the enzyme xanthine oxidase on the outside surface of the endothelial cell plasma membrane. *Surgery*. 1998;124(3):551-60.
322. MatÉs JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999;32(8):595-603.
323. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(supplement_1):S38-S43.
324. Sandström J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(29):19163-6.
325. Marklund S. Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1979;492:19-23.
326. Marks D, Smith C. Marks Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach: Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA; 2004.
327. Hill MF, Palace VP, Kaur K, Kumar D, Khaper N, Singal PK. Reduction in oxidative stress and modulation of heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Experimental & Clinical Cardiology*. 2005;10(3):146.
328. Ghatak A, Brar MJS, Agarwal A, Goel N, Rastogi AK, Vaish AK, et al. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *International journal of cardiology*. 1996;57(2):119-27.
329. Lieberman M, Marks AD. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
330. Borch E, Bargelli V, Stillitano F, Giordano C, Sebastiani M, Nassi PA, et al. Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2010;1802(3):331-8.
331. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1962;98(2):253-61.
332. Durak I, Canbolat O, Kavutçu M, Öztürk HS, Yurtarslani Z. Activities of total, cytoplasmic, and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*. 1996;10(1):17-20.

333. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*. 1988;34(3):497-500.
334. Aebi H. Catalase. *Methods of enzymatic analysis*. 1974:673-7.
335. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Analytical biochemistry*. 1974;62(2):426-35.
336. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967;70(1):158-69.
337. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine*. 2009;150(9):604-12.
338. McDonagh T, Robb S, Murdoch D, Morton J, Ford I, Morrison C, et al. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *The Lancet*. 1998;351(9095):9-13.
339. Heidenreich PA, Gubens MA, Fonarow GC, Konstam MA, Stevenson LW, Shekelle PG. Cost-effectiveness of screening with B-type natriuretic peptide to identify patients with reduced left ventricular ejection fraction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(6):1019-26.
340. Yamamoto K, Ikeda U, Sekiguchi H, Shimada K. Plasma levels of adrenomedullin in patients with mitral stenosis. *American heart journal*. 1998;135(3):542-9.
341. Neumann JT, Tzikas S, Funke-Kaiser A, Wilde S, Appelbaum S, Keller T, et al. Association of MR-proadrenomedullin with cardiovascular risk factors and subclinical cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):451-9.
342. Jensen K, Carstens J, Pedersen EB. Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1998;274(1):F63-F72.
343. Nagaya N, Nishikimi T, Horio T, Yoshihara F, Kanazawa A, Matsuo H, et al. Cardiovascular and renal effects of adrenomedullin in rats with heart failure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1999;276(1):R213-R8.
344. Pozsonyi Z, Föhrész Z, Gombos T, Karádi I, Jánoskúti L, Prohászka Z. Copeptin (C-terminal pro arginine-vasopressin) is an independent long-term prognostic marker in heart failure with reduced ejection fraction. *Heart, Lung and Circulation*. 2015;24(4):359-67.
345. Maisel A, Xue Y, Shah K, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, et al. Increased 90-day mortality in patients with acute heart failure with elevated copeptin. *Circulation: Heart Failure*. 2011;4(5):613-20.
346. Neuhold S, Huelsmann M, Strunk G, Stoiser B, Struck J, Morgenthaler NG, et al. Comparison of copeptin, B-type natriuretic peptide, and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure: prediction of death at different stages of the disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(4):266-72.

347. Voors AA, von Haehling S, Anker SD, Hillege HL, Struck J, Hartmann O, et al. C-terminal proasopressin (copeptin) is a strong prognostic marker in patients with heart failure after an acute myocardial infarction: results from the OPTIMAAL study. *European heart journal*. 2009;30(10):1187-94.



EKLER

Ek.1 ETİK KURUL KARARI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarının kanlarında BNP ile proadrenomedullin, kopeptin ve oksidatif stres arasındaki ilişkinin araştırılması	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU			

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Belge Adı	Tarihi	Açıklama
KARAR BİLGİLERİ	SIGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	ILAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	
Karar No 13-599-16		Tarih: 25 Temmuz 2016	
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Süha YAĞCIOĞLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Mühürbe SUTAY	İşletme	-	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

28 Temmuz 2016

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarının kanlarında BNP ile proadrenomedüllerin, kopeptin ve oksidatif stres arasındaki ilişkisinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Erdinç DEVRİM			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözlemsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐			
	İlaç dışı klinik araştırma	☐			
	Diğer ise belirtiniz: Korelasyonel Araştırma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr. Mehmet MELLİ
İmza:

M. Melli

28 Temmuz 2016



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Ek.2 BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın adı: Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarının kanlarında BNP ile proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidatif stres arasındaki ilişkinin araştırılması

Sorumlu araştırmacı: Prof. Dr. Erdiç DEVRİM

Araştırmanın yürütüleceği yer: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Sayın gönüllü

.....
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda "Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği hastalarında BNP (beyin natriüretik peptid) ile proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidan/antioksidan parametrelerin ilişkisi" adında bir çalışma yapılmaktadır. Bu çalışma araştırma amaçlı bir tez çalışmasıdır.

Bu çalışmanın amacı, düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği olan hastalarda proadrenomedüllin, kopeptin ve oksidan/antioksidan parametrelerin, bu hastaların takibinde daha sık kullanılan BNP ile ilişkisini ortaya koyup kalp yetmezliğinin takibinde klinik olarak kullanılabilirliklerini araştırmaktır.

Bu araştırmada, sizin hastalığınızın rutin takibinde kullanılan BNP testi Ankara Üniversitesi, İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarında normal şekilde çalışılacaktır. Proadrenomedüllin ve kopeptin testleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında ELISA (enzim bağımlı immün ölçüm yöntemi) yöntemi ile çalışılacaktır. Oksidan/antioksidan parametreler ise yine Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında kendine özgü yöntemlerle çalışılacaktır. Araştırmaya katılmaya karar vermeniz halinde sizden fazladan 2 tüp (toplam 12 mL) kan alınarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarında, Cebeci Hastanesi Merkez Laboratuvarında ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yukarıda bahsedilen kan parametreleri ölçülecektir. Adı geçen testler araştırma amaçlı testlerdir. Bu araştırmada sizin vücudunuza zarar verecek herhangi bir ek girişimsel işlem yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmanız zorunlu değildir, tamamen sizin isteğinize bağlıdır. İstedığınız zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilirsiniz veya araştırmadan çekilebilirsiniz.

Bu araştırmaya katılıp katılmamanız rutin takip veya tedavi sonucunuzu etkilemeyecektir. Herhangi bir rahatsızlık oluşturacak işleme tabi tutulmayacaksınız. Bu araştırma nedeniyle hiçbir risk ya da rahatsızlığa maruz bırakılmayacaksınız. Bu araştırma sizin için hiçbir ek risk taşımamaktadır.

Sizden alınmış olan kanlarda, yukarıda adı geçen araştırma amaçlı testler haricinde hiçbir ek çalışma yapılmayacaktır, genetik analiz vb. değerlendirmelere tabi tutulmayacaktır. Kanlarınız Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı haricinde hiçbir yere gótürölmeyecektir, ölkede dışına gönderilmeyecektir.

Araştırmaya katılmaya karar vermeniz halinde size veya sosyal güvenlik kurumunuza (Emekli Sandığı, SGK, Yeşil Kart, özel sigorta vb.) herhangi bir ek mali yük getirilmeyecektir. Araştırmanın bütçesi Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğüne sunularak oradan alınacak destekle karşılanacaktır. Bunun yanında, araştırmaya katılmanız da size ek bir mali fayda sağlamayacaktır.

Araştırmacılar, Etik Kurul, Sağlık Bakanlığı ve diğer ilgili sağlık otoriteleri, araştırmaya katılmanız halinde orijinal tıbbi kayıtlarınıza erişebileceklerdir, ancak bu bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır. Yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla siz veya yasal temsilciniz söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız. İlgili mevzuat gereğince kimliğinizi ortaya çıkaracak bütün kayıtlar gizli tutulacaktır, kamuoyuna açıklanmayacaktır; araştırma sonuçlarımızın bilimsel ortamda yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

Bu araştırmaya ilk etapta 18 yaş üstü 72 gönüllünün katılması öngörülmektedir.

Bu araştırmayla ilgili her türlü sorunuz ve sorunuzla ilgili Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden yardımcı araştırıcı Dr. Ömer YAVUZ'la 24 saat iletişime geçebilirsiniz. Kendisine ulaşabileceğiniz telefon numarası 0533 625 42 07'dır. Elektronik ileti adresi bxo86@hotmail.com'dur.

OLUR FORMU

Ben

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı Soyadı:	Tarih: ... / ... / 2016	İmza
Adres:	Telefon: 0 0	
Doktor Adı Soyadı: Araş. Gör. Dr. Ömer YAVUZ	Tarih: ... / ... / 2016	İmza
Adres: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Morfoloji Yerleşkesi Dekanlık Binası 1. Kat Sıhhiye/ANKARA	Telefon: 0 533 6254207 0 312 5958268	