

**T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KALP YETERSİZLİĞİNDE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI VE
İNFLAMATUAR BELİRTEÇLERLE İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. OĞUZ KILIÇ**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. İSMAİL DOĞU KILIÇ**

DENİZLİ-2019

T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KALP YETERSİZLİĞİNDE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI VE
İNFLAMATUAR BELİRTEÇLERLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. OĞUZ KILIÇ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. İSMAİL DOĞU KILIÇ

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin
17.01.2018 tarih ve 2018TIPF005 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2019

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. İ. Doğu KILIÇ danışmanlığında Dr. Oğuz Kılıç tarafından yapılan “Kalp Yetersizliğinde Bağırsak Mikrobiyotası ve İnflamatuvar Belirteçlerle İlişkisi” başlıklı tez çalışması 05/07/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Kardiyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: DOÇ. DR. İ. DOĞU KILIÇ

ÜYE: DOÇ. DR. YALIN TOLGA YAYLALI

ÜYE: DOÇ. DR. HASAN GÜNGÖR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

16.07/2019

Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı
Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ
Dekan

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim boyunca bana her konuda desteğini esirgemeyen tez hocam Doç. Dr. İsmail Doğu KILIÇ' a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Desteğini her zaman hissettiğim sevgili eőim ve tüm aileme teşekkür ederim.

Tez verilerinden sonuçların elde edilmesinde yardım eden Doç. Dr. Yavuz DODURGA, Doç. Dr. Ömer ŐİMŐEK, Arő. Gör. Dr. Mücahit Seçme, Arő. Gör. Halil İbrahim KAYA ve verilerin istatistiksel analizinin yapılmasında emeklerinden ötürü Prof. Dr. Çağrı ERĐİN' e teşekkür ederim.

Kardiyoloji ihtisasım boyunca bilgi ve tecrübelerini samimi ve içten duygularla paylaşan Prof. Dr. Asuman KAFTAN, Prof. Dr. Dursun DURSUNOĞLU, Prof. Dr. Halil TANRIVERDİ, Doç. Dr. Yalın Tolga YAYLALI, Doç. Dr. Gökay NAR ve Dr. Öğr. Üyesi Samet YILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Koray ADALI hocalarıma teőekkürü borç bilirim.

Dr. Oğuz KILIÇ

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalp Yetersizliği.....	3
2.1.1. Kalp Yetersizliği Tanımı ve Fizyopatolojisi	3
2.1.2. Kalp Yetersizliği Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	5
2.1.3. Kalp Yetersizliği ve İnflamasyon.....	6
2.2. İntestinal Mikrobiyota.....	8
2.2.1. İntestinal Mikrobiyotaya Tanımı	8
2.2.2. İntestinal Mikrobiyotanın Oluşumu ve Gelişimi.....	9
2.2.3. İntestinal Mikrobiyotadaki Mikroorganizmaların Fizyolojik İşlevleri.....	10
2.2.4. Bağırsak Mikrobiyotası İçeriğini Etkileyen Faktörler	12
2.2.5. Disbiyozis ve Kalp Yetersizliği.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1 Gönüllü Seçimi ve Hastaların Gruplandırılması	14
3.2 Hasta Numunelerinin Alınması, Saklanması	14
3.3 Ölçüm Yöntemleri.....	15
3.3.1. RNA İzolasyonu	15
3.3.2. cDNA Sentezi.....	16
3.3.3. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PZR) İle mRNA Ekspresyon Değişiminin .	16
Belirlenmesi	16
3.3.4. Eliza Deneyleri	17
3.3.5. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	17
3.3.6. Katılımcıların Bağırsak Mikroflorasının Belirlenmesi	18
3.3.7. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	19
4. BULGULAR.....	20
4.1. Katılımcıların Özellikleri	20
4.2. Çalışmaya katılan hasta ve sağlıklı gönüllülerde ölçülen parametrelerin	
incelenmesi	21

4.2. İnflamasyon marker düzeyleri ile mikrobiyal çeşitlilik arasındaki ilişkinin incelenmesi	21
4.3 Kalp yetersizliği ve sağlıklı kontrol grubunda gut mikrobiyotanın incelenmesi	22
5. TARTIŞMA.....	30
KAYNAKLAR.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KKY: Kronik Kalp Yetersizliği

DM: Diabetes Mellitus

ESC: European Society of Cardiology

HT: Hipertansiyon

TNF- Alfa: Tumor Necrosis Factor- Alfa

ESR: Eritrosit Sedimentasyon Hızı

CRP: C-reaktif protein

hs-CRP: High sensitive C- reaktif protein

IL: İnterlökin

LPS: Lipopolisakkarit

TLR: Toll Like Reseptör

FXR: Farnesid X Reseptör

TMA: Trimetilamin

TMAO: Trimetilamin- N- Oksit

ACCLAIM: Advanced Chronic Heart Failure CLinical Assessment of Immune Modulation Therapy

NHYA: New York Kalp Cemiyeti

CANTOS: Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study

KZYA: Kısa Zincirli Yağ Asidi

GPR41: G Protein Bağlı Reseptör 41

GPR43: G Protein Bağlı Reseptör 43

FFAR2: Serbest Yağ Asidi Reseptörü 2

FFAR3: Serbest Yağ Asidi Reseptörü 3

GLP-1:Glukagon Like Peptid-1

PYY: Peptid YY

GF: Germ Free

SV: Sol Ventrikül

BNP: B tipi Natriüretik Peptid

NT- proBNP: N Terminal proBNP

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-PZR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR- DGGE: Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Denatüre Gradient Jel Elektroforezi

DNAase: Deoksiribonuklease

RNAase: Ribonuclease

rRNA: Ribozomal Ribonükleaz

LBP: Lipopolysaccharide Binding Protein

OTU: Operational Taxonomic Units

PCoA: Principal Coordinate Analysis

RA: Relative Abundance

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Gut Mikrobiyota ve Kardiyovasküler ve Kardiyometabolik Hastalıklara Bağlı Olası Moleküler Yollar.

Şekil 2: İntestinal Mikrobiyatanın Oluşumu ve Gelişimi

Şekil 3: Disbiyotik ve Sağlıklı Bağırsak Mikrobiyotasının Konak Sağlığı Üzerine Etkileri

Şekil 4: pBNP (ng/ml) düzeyi ile mikrobiyota alfa çeşitlilik arasındaki ilişki

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: cDNA Sentez Karışımı

Tablo 2: Çalışmamızda Kullanılan Genlerin Forward ve Reverse Primer Dizileri

Tablo 3: PZR-DGGE Analizinde Denatüre Çözeltilinin Hazırlanmasında Kullanılan Temel Bileşenler ve Oranları.

Tablo 4: Katılımcıların Özellikleri

Tablo 5: İnflamatuvar Markerların Her İki Grupta ve Toplamdaki Ortalama Değerleri

Tablo 6: Hasta ve Kontrol Grubunda Yüksek Saptanan Mikroorganizmalar

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Chao1-tahmini OTU sayısı ve Shannon indeksi (A, B, C, D).

KKY hastalarından ve kontrol deneklerinden elde edilen bağırsak

mikrobiyata örnekleri. Bireylerin bağırsak mikrobiyal toplulukları arasındaki

UniFrac mesafenin Principal Coordinate Analysis'i (PCoA) (E)

Resim 2: Grafik ordinatları; RA (%): Göreceli doygunluk (Relative abundance)

Kalp yetersizliği hastalarından ve kontrol deneklerinden elde edilen gut

mikrobiyata örneklerinde taksonun göreceli doygunluğu. (A, B, C) Aile

seviyesi. (D, E, F) Cins seviyesi. (G) Tür

ÖZET

KALP YETERSİZLİĞİNDE BAĞIRSAK MİKROBİYATASI VE İNFLAMATUAR BELİRTEÇLERLE İLİŞKİSİ

Giriş: Mikrobiyaya, kalp yetersizliği de dâhil olmak üzere birçok metabolik hastalığa katkıda bulunan olarak kabul edilmiştir.

Amaç: Koroner arter hastalarında, kalp yetersizliği olan ve olmayan grupların mikrobiyal kompozisyonları karşılaştırılarak, kalp yetersizliğinin altta yatan hastalıktan bağımsız intestinal mikrobiyaya üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

Metod: Semptomatik kronik kalp yetersizliği olan 19 hasta (ejeksiyon fraksiyonu < %40) kalp yetersizliği grubuna ve korunmuş ejeksiyon fraksiyonu olan 21 hasta kontrol grubuna dahil edildi. Tüm hastaların anjiyografik olarak belgelenmiş koroner arter hastalığı vardı. Aktif enfeksiyon, kronik enflamatuvar hastalıklar, malignite, böbrek replasman tedavisi gerektiren böbrek yetersizliği, gastrointestinal cerrahi öyküsü, son 2 ayda antibiyotik, probiyotik veya steroid içeren immün baskılayıcı ajanların kullanımı öyküsü olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Dışkı örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu denatüre gradyan jel elektroforezi (PCR-DGGE) ve metagenomix yaklaşımı kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel ve biyolojik çeşitlilik analizleri için R (Ver 3.5.0) yazılımı kullanılmıştır.

Bulgular: Shannon and Chao-1 gibi α - çeşitlilik indeksi için hasta ve sağlıklı grup arasında şube, cins ve tür mikrobiyaya düzeyinde anlamlı fark saptanmadı. Hem cins düzeyinde enterokok ($p<0.05$) hem de tür düzeyinde lactobacillus letivazi ($p<0.01$) hastalarda sağlıklı kontrollerden daha yüksek saptandı. Hastalardaki birçok cins ve tür kontrollerden daha düşük saptandı ($p<0.05$). NT-pBNP mikrobiyaya çeşitliliği ile ilişkili idi.

Sonuç: Koroner arter hastalığından bağımsız olarak kalp yetersizliğinin varlığı bağırsak mikrobiyaya çeşitliliğini değiştirmedir.

Anahtar kelimeler: kalp yetersizliği, mikrobiyaya, çeşitlilik

SUMMARY

INTESTINAL MICROBIASIS AND ITS RELATIONSHIP WITH INFLAMMATORY INDICATOR IN HEART FAILURE

Objective: Microbiota has been recognized as a contributor to many metabolic diseases including heart failure.

Purpose: We aimed to investigate the effect of heart failure on intestinal microbiota independent of underlying disease, by comparing the microbial composition in patients with coronary artery disease with or without heart failure.

Methods: Nineteen patients with symptomatic chronic systolic heart failure (ejection fraction <40%) were included in the heart failure group, whereas 21 patients with preserved ejection fraction served as the control group. All patients had angiographically documented coronary artery disease. Patients with active infection, chronic inflammatory diseases, malignancy, renal failure requiring renal replacement therapy, gastrointestinal surgical history, receiving immunosuppressive agents including antibiotics, probiotics or steroids in the last 2 months were excluded from the study. Faecal samples were analyzed using polymerase chain reaction-denatured gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and metagenomix approach. R (Ver 3.5.0) software was used for statistical and biodiversity analysis.

Results: For a-diversity index such as Shannon and Chao-1, no statistical difference was found between the 2 groups with respect to microbiota phylum, genus, and species. Enterococcus genus ($p < 0.05$) and Lactobacillus letivazi ($p < 0.01$) species were found more in patients than controls. Many genus and species were found less in patients than controls ($p < 0.05$). Pro-BNP was associated with the diversity of microbiata.

Conclusion: The presence of heart failure did not change the microbial diversity independent of coronary artery disease.

Key words: Heart failure, microbiata, diversity

1.GİRİŞ

Kronik kalp yetersizliği (KKY), kardiyak yapısal ve fonksiyonel anormallikler sonucunda, kalbin vücudun değişen oksijen ve metabolik ihtiyaçlarını karşılamaya yetecek kadar kanı pompalayamaması sonucu ortaya çıkan kompleks klinik bir sendromdur (1). KKY, son derece sık görülen bir rahatsızlık olup artık global bir epidemi olarak kabul edilmektedir.

Miyokard disfonksiyonu, genelde koroner arter hastalığına (KAH) bağlı uzun süreli iskeminin yada geçirilmiş infarktüse bağlı miyokard kitlesi kaybının, optimal tedavi edilmemiş hipertansiyon (HT) ya da kapak hastalığına bağlı süregelen artmış miyokardiyal stresin veya doğrudan toksin maruziyetinin sonucudur. Nadiren fulminan enfeksiyonlar da miyokard hasarına neden olabilir (2). Bazı olgularda da belirli bir neden bulunmaz (2). Başlıca kalp yetersizliği (KY) belirtileri nefes darlığı ve yorgunluk ile sıvı retansiyonudur (3). Amerika Birleşik Devletlerinde KY prevalansı yaklaşık 5.8 milyon civarındadır (4). Her yıl yarım milyondan fazla yeni KY olgusu tanı almaktadır. KY insidansı hem erkeklerde hem kadınlarda 45 yaş üzerinde birbirini izleyen her dekatta iki katına çıkmaktadır (4). Günümüzde beklenen yaşam süresinin artmasıyla yaşlı popülasyon oranı artmakta olup 2040 yılında bu insidansın yılda 700.000 yeni olgu üzerine çıkacağı düşünülmektedir (4).

Basınç ya da hacim artışına bağlı veya miyokard kaybıyla kalbe aşırı iş yükü bindiğinde canlı miyokard hücreleri kontraksiyonu artırmak için hipertrofiye uğrar. Miyokard hücrelerinde meydana gelen biyokimyasal, elektrofizyolojik ve kontraktıl değişiklikler miyokardın mekanik özelliklerinde değişikliğe neden olur (5). Başlangıçta kompanzasyon amacı ile aktive olan bu nörohormonal ve inflamatuvar sistemler, kronik dönemde ventrikül fonksiyonlarını bozarak ve ventrikül yeniden biçimlenmesine neden olarak hastalığın ilerlemesine katkıda bulunurlar (6-8). Mevcut tedaviler klinik semptomları iyileştirir ve kardiyak disfonksiyonun yavaş ilerlemesini sağlasa da, KKY'li hastaların prognozu kötü kalır. Bu durum, KKY patofizyolojisine katkıda bulunan diğer mekanizmaların da araştırılmasının önemini göstermektedir.

Kalp yetersizliğinin değişen bağırsak fonksiyonu ile ilişkili olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (9). İntestinal bariyer normal şartlarda dengeli mikrobiyal bir komünite, intakt mukozal sıkı bağlantılar (tight junctions), normal mukozal bağıışıklık, ve normal sodyum ve su homeostazı ile sürdürülebilir (10). Normal şartlarda bu mikroorganizmaların; patojen kolonizasyonuna karşı bariyer oluşturma, intestinal epitel ve immun sistemini olgunlaştırma

(maturasyon), gastrointestinal hormon sentezinin ve intestinal sinir sisteminin modülasyonu gibi fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (11). Ancak, intestinal mikrobiyotanın KY'nin patofizyolojisindeki yeri ve önemi yeterince araştırılmamıştır.

Son yıllarda bağırsak mikrobiyotasının, KY dahil kardiyovasküler hastalıklar (KVH) üzerinde giderek artan bir etkisinin olduğu vurgulanmaktadır (12). Disbiyozis adı verilen bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler KY'nin fizyopatolojisinde yer alan inflamasyon ile etkileşim halinde olduğu düşünölmektedir (13). Bağırsak mikrobiyotası, gıdalardan enerji elde etmede, lokal veya sistemik inflamasyonu kontrol etmede fizyolojik rol oynar. Konakçı için bu yararlı etkilerinin yanında konakçı ile negatif fizyopatolojik etkileşimleri de olabilir. Örneğın, obezite, diabetes mellitus (DM), gastrointestinal hastalıklar ve kanser dahil birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir (14-16).

Kalp yetersizliğinde, splanknik sirkülasyonun bozulmasıyla oluşan birtakım lokal ve sistemik değişikliklerin bağırsak mikrobiyotasında değişikliğe neden olduğu düşünölmektedir (17). Artan kanıtlar KKY gelişiminin ve klinik seyrinin, pro-ve anti-inflamatuvar sitokinler, adezyon molekülleri ve reaktif oksijen türleri de dahil olmak üzere bir inflamatuvar ortamın altında olduğunu ortaya koymaktadır (18). Ancak, KY'de izlenen bu inflamatuvar sürecin yine KY'de görölen bağırsak mikrobiyotasındaki değişikler ile birbirlerini nasıl etkilediğini gösteren literatür verileri kısıtlıdır. Biz bu çalışmamızda, KY hastalarında bağırsak mikrobiyotasının, KY fizyopatolojisinde önemli bir yeri olan inflamasyon ile ilişkisini incelemeyi amaçlıyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Yetersizliği

2.1.1. Kalp Yetersizliği Tanımı ve Fizyopatolojisi

Kalp yetersizliği, kalbin sistemik metabolik gereksinimleri karşılayacak düzeyde kardiyak debiyi sağlayamadığı kronik, ilerleyici bir durumdur (19). 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 (19). KY'de kalp, doluş basıncını yükseltmez ve venöz dönüşü uyum sağlayamaz. Buna bağlı olarak, nefes darlığı, egzersiz intoleransı, sodyum ve su tutulumu ile kendini gösteren ödem ile karakterize klinik tablo ortaya çıkar. (19)

Kronik kalp yetersizliği, miyokard hasarı ile başlar, ancak kalbin pompalama fonksiyonu ve kalp debisi kompanzasyon mekanizmalarının devreye girmesiyle bir müddet normal sınırlarda kalır (20). Ventrikül duvar hipertrofisi ve kalp boşluklarının genişlemesini içeren bu kompanzasyon döneminde kalp debisi istirahatte normaldir, hatta bir süre efor sırasında da normal sınırlarda kalır. Bu süreç ilerledikçe önce egzersiz esnasında sonra da istirahat halindeyken kalp atım hacmi ve kalp debisi düşer (21). Buna bağlı olarak sempatik sinir sistemi (SSS) ve renin-angiotensin-aldosteron sistemi (RAAS) aktive olur ve periferik vasküler direnç artar (22-23). Vital organlara ve periferik yeterli kan pompalanamaz ve vücudun metabolik ihtiyacı karşılanamaz (22-23). Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu düşer, diyastol sonu basınç artar ve kalp atım hacmi düşer (22-23). Periferik vasküler direncin artması önyükü ve ardyükü artırarak KY'yi daha da ağırlaştırır. Bu süreçlerin tamamında Frank-Starling mekanizması, nöhumoral mekanizmaların aktivasyonu (SSS, RAAS, natriüretik peptidler, arjinin vazopressin, endotelin vs.) ve remodelling olarak adlandırılan ventriküler yeniden yapılanma rol alır (23).

Frank-Starling mekanizmasına göre kalp kasının uyarıya karşı kontraksiyon yanıtı ya hep ya hiç şeklindedir (24). Kalbin kontraksiyon yanıtının başlıca belirleyicisi miyokardın pre-sistolik lif uzunluğudur (25). Lif uzunluğu ne kadar fazlaysa kasılabilirlik de o kadar güçlüdür (25). KY'de kontraktilitenin azalmasıyla atım hacminin düşmesi ventrikülde diyastol sonu hem basıncın hem de hacmin artmasına neden olur (26). Bu da miyokardiyal lif uzunluğunun artmasına neden olur. Sol ventrikül diyastol sonu basıncın artması pulmoner kapiller basıncın yüksekliği ile birliktedir, bu da pulmoner venöz konjesyon ve konjestif semptomlarından sorumludur (26).

Kalp yetersizliğinde, SSS karotisler veya aortadaki baroreseptörler aracılığıyla aktive olur (27). Uyarıyla birlikte miyokard kontraktilitesi ve kalp hızı artar. Vazokonstriksiyon ve

venokontriksiyona bağlı önyük ve ardyükde artış görülür (28). Dolaşımında noradrenalin, adrenalin, endotelin, arjinin vazopressin, renin, anjiyotensin II, aldosteron, natriüretik peptid, tümör nekroz faktör-alfa, interlökin, dopamin, prostaglandin seviyesi artar (29). SSS uyarımı miyokard enerji tüketimini artırır, ventrikülde iskemiye neden olur veya mevcut iskemiye ağırlaştırabilir (30). Kronik adrenerjik aktivasyon sonucu miyositlerde hipertrofi meydana gelir. Ayrıca noradrenalin intrasellüler kalsiyumu artırarak miyokard hücrelerinin ölümüne neden olur veya programlı hücre ölümünü (apoptozis) başlatır (31).

Kalp yetersizliğinde SSS ve lokal oteoregülatör mekanizmalar beyin ve kalbe giden kan miktarını korumaya çalışır. Buna karşın deri, iskelet kasları, splanknik alan ve böbreklere giden kan miktarı azalır (32).

Düşük kalp debisi RAAS aktivasyonuna yol açar. Bu da sodyum ve su tutulmasına neden olur. KKY'de tuz kısıtlaması ve diüretik verilmesi sonrası makula densaya gelen tuz miktarı azalır ve renin salınımı artar (33). Plazma renin aktivitesi hafif KY'de normal bulunabilir ancak orta ve ciddi KY'de plazma renin düzeyi artar (34). Renin anjiyotensin I' in anjiyotensin II' ye dönüşümünü sağlar. Anjiyotensin güçlü bir vazokonstriktördür (34). Vasküler direncin belirgin artmasına neden olur. Anjiyotensin miyositlerde hipertrofi ve programlı hücre ölümünü tetikler ayrıca kardiyak fibroblastlarda hipertrofi ve ekstrasellüler matrikste artış sağlayarak remodelling' e katkı sağlar (34).

İnsanda, atriyal natriüretik peptid (ANP), beyin natriüretik peptid (BNP) ve C-natriüretik peptid olmak üzere 3 adet natriüretik peptid bulunmaktadır (35). ANP, daha çok sağ atriyumda bulunur ve atriyal basınç yüksekliğine yanıt olarak salınır (35). BNP, ventrikül miyokardında depolanır ve ventrikül basıncındaki artışa yanıt olarak salınır (36). C-natriüretik peptid ise daha çok damar çeperinde bulunmaktadır (37). KY'de plazmada dolaşan ANP ve BNP düzeyi artar. Plazmadaki natriüretik peptidlerin ana kaynağı ventrikülde yapılan natriüretik peptidlerdir. Bu nedenle plazma BNP düzeyinin artması KY tanısı ve prognozunun tayininde önemli bir göstergedir (38).

Endotelin, vasküler endotelial hücrelerden salınan güçlü bir vazokonstriktördür (39). KKY' de endothelin-1 düzeyi artar ve prognozun kötüye gidişini gösterir. Endothelin-1 düzeyi yüksekliği aynı zamanda pulmoner vasküler direnci yüksekliğini yansıtır. Pulmoner vasküler direnç artıkça endothelin-1 düzeyi artar (39).

Sitokinler immün hücreler tarafından salınan küçük polipeptidlerdir. KY'de tumor necrosis factor alfa (TNF-alfa), ve interleukin (IL) - 6 gibi sitokinlerin plazma düzeyi yükselir. TNF-alfa ve IL-6 intrasellüler kalsiyum geçişini azaltır ve miyokard fonksiyonunun bozulmasına yol açar, ayrıca miyositlerde hipertrofi ve apaptoza yol açar (40).

Kalp yetersizliğinde çoğu zaman ventrikül şekli değişmektedir. Bu değişiklik ventrikül fonksiyonlarının bozulmasına neden faktöre bağlı olarak lokal ya da diffüzdür. Remodelling olarak adlandırılan bu durumda miyokard kütlesinde artış, ventrikül şeklinde değişiklik ve interstisyel fibröz dokuda artış görülür (41). KY'de meydana gelen remodelling' in sonuçları kötüdür. Ventrikül genişler. Ventrikül duvarındaki stresi, bu da metabolik gereksinimleri artırır. İhtiyaç artışı miyokard iskemisini daha da artırır. İnterstisyel fibröz doku artışı ventrikülün sistolik ve diyastolik fonksiyonlarını bozar ve kapiller miktarını azaltır ve aritmi gelişimine zemin hazırlar. Yapısal değişiklikler kendi içerisinde ilerleyerek daha da ciddileşir (41).

2.1.2. Kalp Yetersizliği Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Kalp yetersizliği son derece sık görülen bir hastalık olup artık global bir epidemi olarak kabul edilmektedir. KY insidansı tüm dünyada giderek artmaktadır. Tüm dünyada 22 milyon kişiyi etkilediği bilinmektedir (42). Bunlara her yıl Dünya' da 2 milyon yeni KY vakası eklenmektedir (42). Ortalama yaşam süresinin gittikçe artış gösterdiği günümüzde, KY hastalarına gittikçe artan oranda rastlanması doğaldır. Gelecekte KY'nin daha önemli bir sağlık sorunu olması kaçınılmaz gibi görünmektedir.

Erkek ve kadınlarda benzer oranlarda görülmektedir. Yaş ilerledikçe hem görülme sıklığında hem de mortalitesinde ciddi bir artış izlenmektedir (42). Framingham Kalp Çalışması' nda 40 yaş sonrası dönemde, KY gelişme riski %20 bulunmuştur. KY görülme sıklığı genel nüfusta %2-3 iken, 70 yaş sonrası % 10-15'lere, 80 yaş sonrası %15-20'lere çıkmaktadır. KY'de prognoz kötü olup hastaların %30-40'ı tanıdan sonra 1 yıl içinde, %60-70'i de 5 yıl içinde ilerleyen pompa yetersizliği ya da ani ölüm nedeniyle kaybedilmektedir (43). Güncel kayıtlara göre hastaneye yatış gereksinimi olan KY hastalarında mortalite %17-18 olarak belirtilmiştir (44)

HT, DM, obezite, iskemik kalp hastalığı, kalp kapak hastalıkları, aritmiler, kronik akciğer hastalıkları, kronik böbrek yetmezliği, kalp kası hastalıkları, ilaçlar, toksik maddeler, yüksek debili durumlar (tirotoksikoz, paget hastalığı, ciddi anemi, beri beri, arteriyovenöz fistül, sepsis, gebelik) veya doğumsal kalp hastalıkları KY'nin majör risk faktörleridir (45-46).

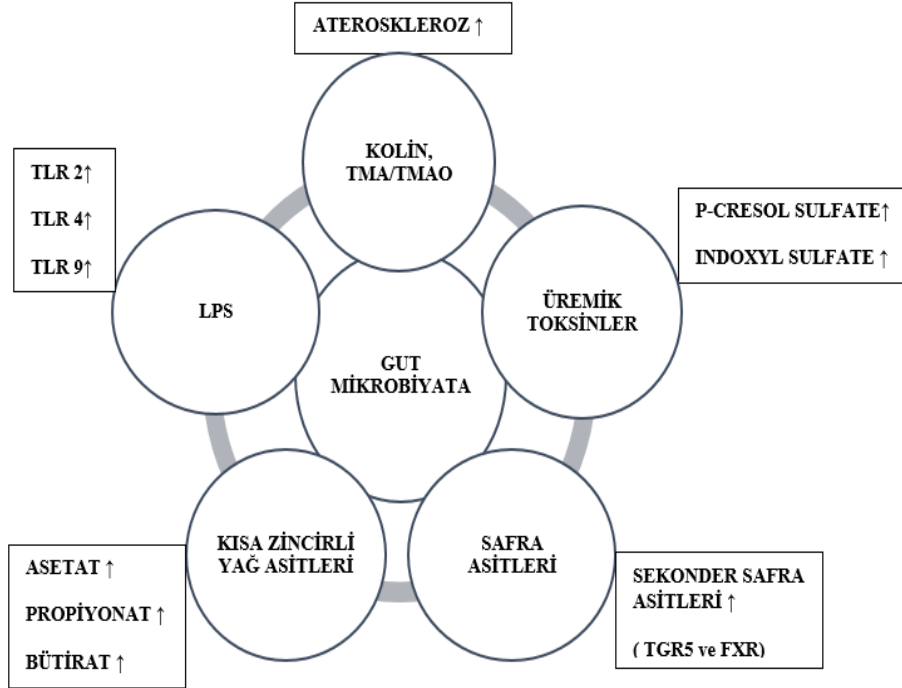
2.1.3. Kalp Yetersizliği ve İnflamasyon

Kalp yetersizliğinde inflamasyonun hastalık gelişimi ve kötü prognozdan sorumlu olabileceği düşünölmektedir (47). Sitokin hipotezine göre, KY kısmen de olsa sitokinlerin kardiyak ve sistemik etkileri ile oluşmakta ve ilerlemektedir. İnflamasyon direkt miyokard hasarına neden olmaktadır (47). Bu hastalarda hemodinamik bozukluklar, vasköler anormallikler ve kardiyak kaşeksi gibi pek çok patolojik sonuç inflamatuvar–proinflamatuvar sitokinler (TNF-alfa, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), C-reaktif protein (CRP), IL-6 ve IL-18) aracılığıyla ile açıklanabilir (48). KY'nin inflamasyonla ilişkisi ilk kez 1955 yılında KY'nin şiddeti ile CRP arasında pozitif korelasyon saptanmasıyla açıklanmıştır (49). KY' nin değişen bağırsak fonksiyonu ile ilişkili olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (50). KY'de yeni terapötik hedefler belirlemek amacıyla yapılan araştırmalarda inflamasyon ve bağırsak mikrobiyotası ilgi odağı haline gelmiş ve son birkaç yıldır bu konuya daha fazla ağırlık verilmiştir.

Sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotası, mukozada sağlam sıkı bağlantılar ve normal mukoza bağışıklığı dahil olmak üzere bağırsak bariyeri fonksiyonunu korur. Adherens kavşak proteinlerine sahip olmayan farelerde kolit geliştiği gözlemlenen bir çalışmada, mukozal bariyeri korumada sağlıklı bir hücre – hücre adezyonunun önemi vurgulanmıştır (51). KKY' nin mevcut bağırsak hipotezinde, bağırsak duvarında ödem ve bariyer fonksiyon bozukluğunun bağırsak mikrobiyota bileşenlerinin translokasyonuna, endotoksemiye ve dolayısıyla yüksek sistemik inflamatuvar duruma yol açtığı vurgulanmaktadır (51). Kanıtlar, konak immönolojik savunma anormalliklerinin yanı sıra splanknik tıkanıklık ile oluşun gastrointestinal sistemin yapısal ve fonksiyonel değişikliklerini içeren bir veya daha fazla mekanizmanın bir sonucu olarak, KY sırasında, artmış bakteriyel transpozisyonun oluştuğunu göstermektedir (51).

Değişmiş bariyer fonksiyonu, bağırsak mikrobiyata bileşenlerinin kan dolaşımına translokasyonuna neden olan hipoperfüze bağırsakların bir sonucu olarak birçok faktörden kaynaklanabilir (52). Azalmış kardiyak debisi ve KY'de ortaya çıkan sempatik vazokonstriksiyon sistemik dolaşımın adaptif yeniden dağılımını uyarır, bu da bağırsak duvarı dahil olmak üzere uç organlarda perfüzyon bozukluğuna yol açar (53). Perfüzyondaki azalmayla birlikte özellikle bağırsak mukozasındaki iskemiye duyarlı villüslerin yapısı etkilenir. Özellikle dekompanze KY olan hastalarda hipoksi nedeniyle intramukozal asidoz görölebilir. KY olan hastalarda yapısal olarak, ödem ile bağırsak duvarı kalınlaşması gözlemlenebilir (54). Mukoza duvarlarındaki kollajen içeriği de, KY'in şiddeti ile orantılı olarak artmaktadır (55). Ayrıca, bağırsak duvarı kalınlaşması, dolaşımdaki inflamasyon marker düzeyleri ve artmış bağırsak geçirgenliği işaretileri ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, bağırsaktaki hem yapısal hem de fonksiyonel değişikliklerin tümü, kötüleşen enterosit sağlığını

doğrudan etkiler ve bağırsak bariyeri bütünlüğünü bozar. Sonuç olarak, bağırsak epitelindeki artmış paraselüler transport KKY’de gözlenebilir (56). (şekil 1)



Şekil 1: Gut mikrobiyota ve kardiyovasküler ve kardiyometabolik hastalıklara bağlı olası moleküler yollar. FXR, farnesoid X reseptörü; LPS, lipopolisakkarit; TLR, Toll like reseptör; TMA, trimetilamin; ve TMAO, trimetilamin N-oksit

Bağırsak bariyeri, LPS olarak da bilinen ve kan dolaşımına kolayca girebilen endotoksine izin verebilir. LPS, gram-negatif bakterilerin dış membranı üzerinde bulunur ve TLR-4 aracılığıyla geniş bir yelpazedeki inflamatuvar ürünlerin salınımını indükleyebilir (57). Dahası, bu etki, makrofajlar, dendritik hücreler, kardiyomiyositler ve kardiyak fibroblastlar gibi birçok doku ve hücre tipi ile gerçekleşir. Dekompanse KY olan hastalarda daha yüksek kan endotoksin düzeyleri vardır (57). Çalışmalar, endotoksinin bağırsak emiliminin, KY sırasında inflamatuvar sitokinlerde sistemik artışlar için önemli bir uyarıcı olduğunu göstermektedir. KKY'li hastalarda, dolaşımdaki artmış sitokin düzeyleri (TNF-a, IL-1 ve IL-6 gibi) daha şiddetli klinik semptomlarla ilişkilidir ve sağkalım daha kötüdür (58). TNF, IL-1 β ve IL-6'nın artan serum konsantrasyonlarının da bağırsak geçirgenliğinin güçlü indükleyicileri olduğu gösterilmiştir (57-58). Bu artan geçirgenlik, kan dolaşımında inflamatuvar sitokin birikimini ve artmış endotoksin translokasyonunun ilerlemesini artırır. İlginç bir şekilde, KKY'li hastalarda plazma endotoksin düzeylerinin diüretik veya antibiyotik tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir, ancak

plazma sitokin düzeylerinin her zaman değişmediği gözlemlenmiştir, bu da hastalık süreci tetiklendiğinde sürekli bir etki olduğunu düşündürmektedir (59).

ACCLAIM çalışmasında nonspesifik immünomodülasyon tedavisini araştırılmıştır. Bu çalışmada, hasta kanı, hücre ölümünü indüklemek için (ısı, ozonlama ve ultraviyole ışınlanmanın bir kombinasyonu yoluyla) strese maruz bırakılmış ve ortaya çıkan materyal, bir anti-enflamatuar uyaran üretmek için hastaya yeniden enjekte edilmiştir. Bu çalışmadaki tüm nedenlere bağlı mortalite veya kardiyovasküler ilişkili hastane yatışlarında primer sonlanma noktası karşılanmamış olmasına rağmen, post-hoc analizde, NYHA-II kronik KY olan hastaların alt gruplarının tüm nedenlere bağlı mortalite ve kardiyovasküler nedenler için hastane yatışlarında anlamlı düşüşler olmuştur (60). Ayrıca IL-1β'e karşı bir monoklonal antikor olan kanakinumab kullanımını araştıran CANTOS çalışması, inflamatuvar yolun inhibe edilmesinin lipidden bağımsız istenmeyen kardiyovasküler olay riskini azaltabileceğini ilk defa göstermiştir (61).

2.2. İntestinal Mikrobiyota

2.2.1. İntestinal Mikrobiyota Tanımı

Mikrobiyota; insanlarla birlikte yaşayan özel türlerin tamamını, mikrobiyom ise insanlarla kommensal olarak yaşayan mikroorganizmaların taşıdıkları genleri ifade etmektedir (62). İnsan vücudunda birçok organ ve dokuda kolonize olmuş toplam 10^{14} mikroorganizma olduğu tahmin edilmektedir. Bu mikroorganizmaların büyük çoğunluğunu bakteriler, virüsler, funguslar oluşturmaktadır (63). İnsan mikrobiyotasının büyük kısmı başta gastrointestinal sistem olmak üzere deri, genitoüriner sistem ve solunum sisteminde kolonize olmuştur. Gastrointestinal sistem içerdiği zengin besin öğeleri ile kolonizasyon için en uygun ortamı sunmaktadır. Bu nedenle kolon, vücudumuzdaki mikroorganizmaların %70'inden fazlasını barındırmaktadır (63).

İntestinal mikrobiyata ekosisteminde bulunan bakteri sayısı ve çeşitliliği konusunda net bilgilere ulaşmak oldukça zordur. Günümüzde moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemeler bağırsak mikrobiyotasının anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır. Son yapılan çalışmalara göre gastrointestinal sistemde 35.000'den fazla bakteri türünün olduğu tahmin edilmektedir (64).

Gastrointestinal sistem mikrobiyotasında; anaerob, fakültatif anaerob, aerob bakteriler bulunmaktadır. Ancak intestinal mikrobiyotanın en önemli kısmını başta Bacteroides ve Firmicutes'ların yer aldığı anaerob bakteriler oluşturur. Bacteroides ve Firmicutes'ların dışında intestinal florada bulunan diğer önemli anaerob bakteriler arasında Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria, Lentisphaerae, Spirochaet ve Cyanobacteria'lar sayılabilir (65).

Fizyolojik koşullarda bağırsak mikrobiyotasında son derece dinamik bir denge söz konusudur. Günlük diyet ve çevre değişiklikleri ile mikrobiyotada kısa süreli değişiklikler gözlenebildiği gibi, yaşlanmayla birlikte uzun süreli ve kalıcı değişiklikler meydana gelebilir. Özellikle diyet alışkanlığı gastrointestinal sistem mikrobiyotasını etkileyen majör faktörlerden birisidir. Karbonhidratlardan zengin beslenme alışkanlığı, mikrobiyotada belirgin değişikliklere yol açarken; insanlarda özellikle inulin içeren prebiyotik tüketimi *F. Prausnitzii* ve *Bifidobacterium*'ların florada daha baskın hale gelmesine yol açmaktadır (66).

2.2.2. İntestinal Mikrobiyotanın Oluşumu ve Gelişimi

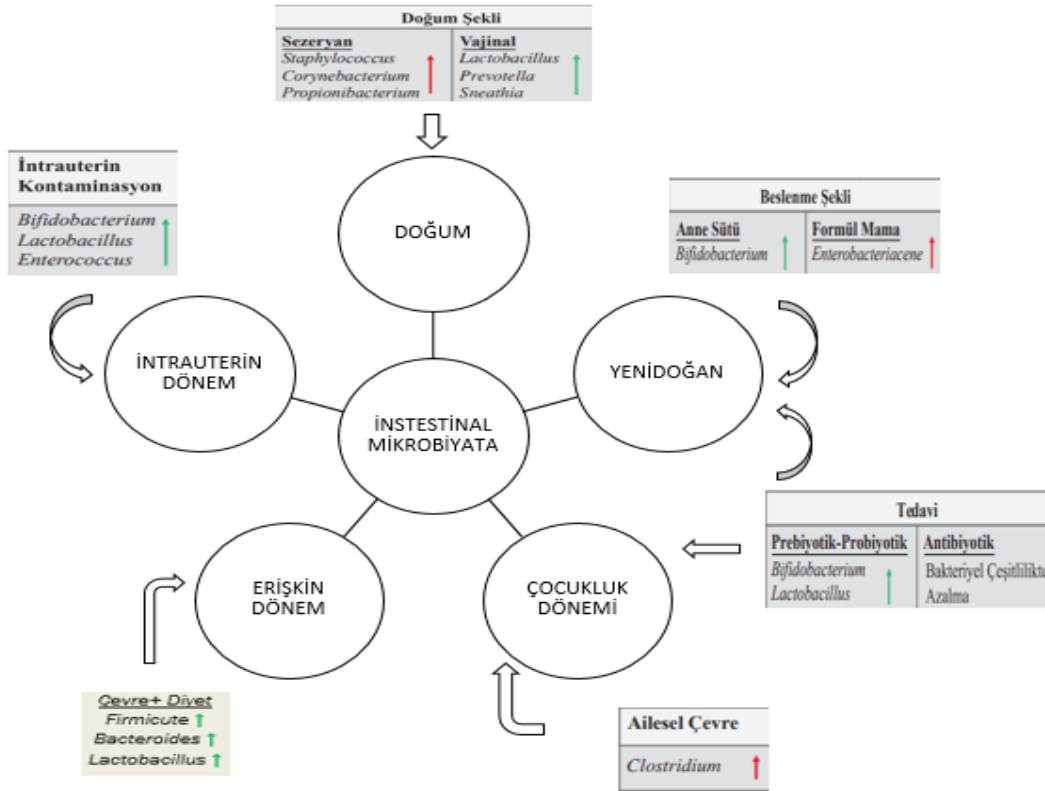
Anne karnında fetüsün bağırsağı fizyolojik olarak steril haldedir. İnsanlarda sindirim sistemi mikrobiyotası doğumla birlikte şekillenmeye başlamaktadır (67). Doğum şeklinin bebeğin intestinal mikrobiyotası ile ilişkili olduğu yenidoğanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bebeğin intestinal mikrobiyotasını, vajinal yolla doğan bebeklerde anne genitoüriner sistem mikroorganizmaları oluştururken, sezaryen ile doğanlarda ise annenin deri mikroorganizmalarına benzer şekilde oluştuğu görülmüştür (68). İnfant dönemde ise gastrointestinal sistem mikrobiyotasını etkileyen en önemli faktörler; beslenme şekli, gestasyonel yaş, hospitalizasyon ve bu dönemdeki sık antibiyotik kullanımımıdır. Çalışmalarda anne sütü ile beslenen infantlardaki mikrobiyota ile, formül mamalar ile beslenen infantların mikrobiyotasının farklı olduğu gösterilmiştir. Anne sütü ile beslenen infantlarda mikrobiyotanın çoğunu *Bifidobakteri*'ler oluştururken, formül mama ile beslenenlerde ise *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* ve *Lactobacillus*'lar baskın haldedir (69).

Yenidoğan ve infant döneminde, intestinal mikrobiyota oluşumundaki bu farklılık, immün sistem gelişiminde önemli rol oynamaktadır (70). Bir yaşından sonra intestinal mikrobiyota genç bir insanın sindirim sistemi mikrobiyotasına benzer hale gelir.

Erişkin dönemde intestinal mikrobiyota son şeklini almıştır ve bu dönemde intestinal mikrobiyotanın yaklaşık %95'ini Firmicute ve *Bacteroides*'ler oluşturur. Sağlıklı gönüllülerde mide içeriğinin her gramında 10 bakteri bulunduğu ve bu bakterilerin başlıca *Lactobacillus*, *Veillonella* ve *Helicobacter*'den oluştuğu rapor edilmiştir. Duodenumda 10^3 /gram, jejunumda 10^4 /gram ve ileumda ise 10^7 /gram bakteri olduğu saptanmıştır. İnce bağırsaktan izole edilen bakteriler ise sırasıyla; *Bacillus*, *Streptococcus*, *Actinobacteria*, *Actinomycinea* ve *Corynebacteria*'lardır. Kolonda ise bakteri sayısı 10^{12} /gram'a çıkmaktadır. Bu bakterileri başlıca, *Bacteroidetes*, *Lachnospiraceae* ve Firmicute'lar oluşturmaktadır (71-72).

Yaşlanma ile birlikte sindirim sistemi mikrobiyotasında bir takım değişiklikler meydana gelir. Geriatrik popülasyonlarda yapılan çalışmalar yaşlanma ile mikrobiyotada, hem bakteri

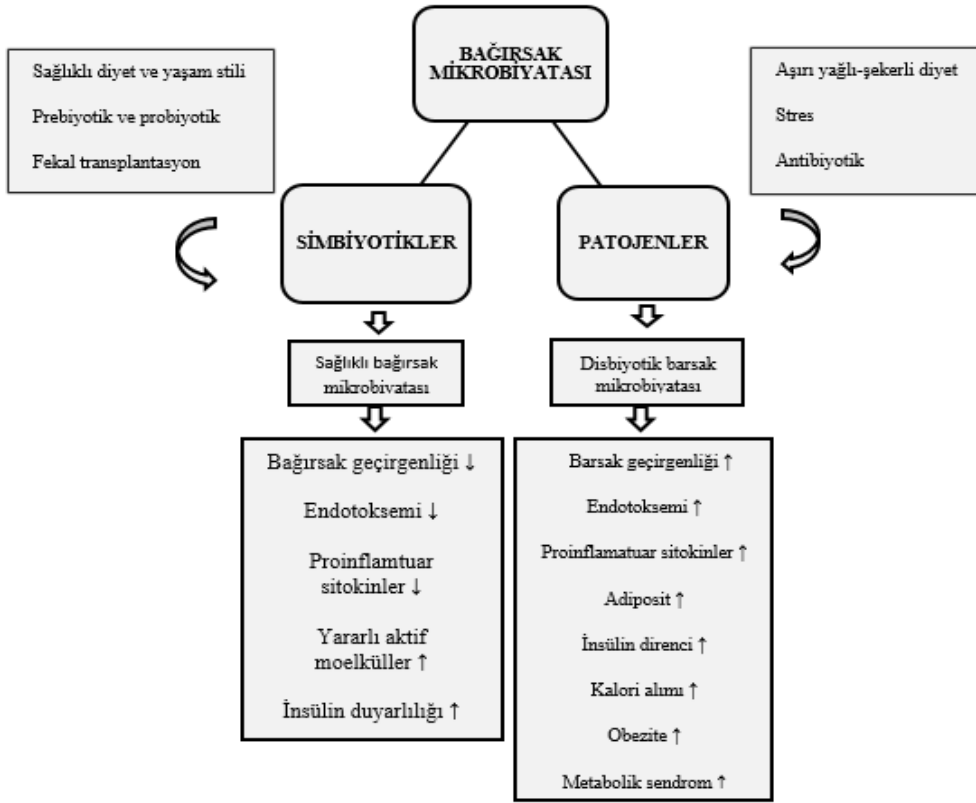
sayısında hem de çeşitliliğinde belirgin azalmalar meydana geldiğini göstermiştir. Diğer yandan yaşlılıkta mikrobiyotadaki değişiklikler; diğer sistemik hastalıklar, diyet alışkanlıkları, kullanılan ilaçlar ve bireyin yaşadığı çevre (bakım evi, hastane, ev vb.) ile sıkı ilişki göstermektedir (72). (Şekil 2)



Şekil 2: intestinal mikrobiyotanın oluşumu ve gelişimi

2.2.3. İntestinal Mikrobiyotadaki Mikroorganizmaların Fizyolojik İşlevleri

Bağırsak mikrobiyotası, sağlığımızı doğrudan şekillendiren önemli katkılar sağlar. Bağırsak mikrobiyotasının; diet fiberlerinin fermantasyonu, çeşitli besinlerin ekstraksiyonu ve bazı vitaminlerin sentezi, patojen kolonizasyonuna karşı bariyer oluşturma, intestinal epitel ve immun sistemini olgunlaştırma (maturasyon), gastrointestinal hormon sentezinin ve intestinal sinir sisteminin modülasyonu gibi fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (73). Yutulan antijenik yiyeceklere oral toleransı etkiler. Bağırsak mikrobiyotası potansiyel olarak zararlı bakterilerin aşırı çoğalmasını veya kolonizasyonunu, mikrobiyota ortamını kontrol altında tutabilen nispeten duyarlı bileşikler ve bakteriyosinler gibi, rekabetçi dışlama ve çeşitli kimyasal araçların üretimi yoluyla bastırarak temel bir bariyer işlevini de görür (73).



Şekil 3: Disbiyotik ve sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının konak sağlığı üzerine etkileri

Sindirilemeyen karbonhidratlar ve bitki polisakkaridlerinden enerji elde edilmesinde konağa yardımcı olmaktadır (74). Bağırsak bakterileri tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) (asetat, bütirat, propiyonat) karbon ve enerji kaynağı olarak konak tarafından kullanılmaktadır. KZYA, GPR41 (FFAR3) ve GPR43 (FFAR2) gibi G-protein kenetli reseptörlere (GPCR) bağlanmaktadır. Bu reseptörler metabolizmanın enerji döngüsünü düzenlemektedir.(75). Bütirat; enteroendokrin L hücrelerinden glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve peptid YY (PYY) salınımı ile iştahı baskılamaktadır. Glukagon benzeri peptid-1'in artışı adiposit insülin duyarlılığını arttırmaktadır ve sonuç olarak adipoz dokuda yağ birikimini engellemektedir. Bunun yanı sıra artmış fekal KZYA; insanlarda metabolik sendrom ile pozitif olarak ilişkili bulunmuş ve TLR5-KO farelerde disbiyotik mikrobiyota tarafından KZYA'nın kontrolsüz üretiminin metabolik sendroma katkısı olduğu gösterilmiştir (76). Son zamanlarda yapılmış bir çalışmada, yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda obezite ile propiyonat/asetat üreten *Phascolarctobacterium*, *Proteus mirabilis* ve *Veillonellaceae*'nin miktarının pozitif korele olduğu gösterilmiştir (77).

2.2.4. Bağırsak Mikrobiyotası İçeriğini Etkileyen Faktörler

Bağırsak mikrobiyotası düzenlenmesinde diyet, yaşam tarzı, antibiyotikler ve genetik geçiş etkilidir. Besinler mikrobiyata çeşitliliğini sağlayan temel etkidir. Araştırmalarda diyetteki değişikliklerin mikrobiyotadaki varyasyonların %57'den; konağın genetik varyasyonlarının ise %12'inden sorumlu olduğu gösterilmiştir (78). Bebeklerde yapılan bir çalışmada anne sütü ile beslenen bebeklerde *Bifidobacterium* spp. sayısı hazır mamalar ile beslenen bebeklere göre daha yüksek bulunmuştur (78). Başka bir çalışmada; şehirde yaşayan İtalyan çocukların bağırsak mikrobiyotası kırsal kesimde yaşayan Afrikalı çocukların bağırsak mikrobiyotası ile karşılaştırılmış, *Bacteroides* yoğunluğu daha düşük ve *Enterobacteriaceae* yoğunluğu ise daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar İtalyan çocuklarının polisakkarit içeren bitkileri düşük oranda tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (79). Turnbaugh ve ark. yaptığı bir çalışmada; insan feçesini germ-free (GF, mikropsuz) fareye transplante etmişlerdir. Farenin düşük yağlı-bitki polisakkaridi ile zengin diyetinin yüksek yağlı ve şekerli diyet (Western/batı tipi diyet) ile değiştirilmesi ile, Firmicutes kolunun *Erysipelotrichi* sınıfı bakteri sayısının arttığı, *Bacteroides* spp. sayısının ise azaldığı saptanmıştır (80).

Probiyotik ve prebiyotikler ise bağırsak mikrobiyotasının metabolik aktivitesini ve bileşimini kontrol ettiği düşünülen patojen olmayan mikroorganizmalardır. Fermente edilmiş besin lifleridir. Obeziteye karşı faydalı olabilecekleri gösterilmiştir (81). Hiperkolesterolemisi olan bireylerde *Lactobacillus reuteri* türünün LDL-kolesterolü belirgin şekilde düşürdüğü Jones ve ark. tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir (82)

Mikrobiyota kompozisyonunu değiştiren temel faktörlerden biri de antibiyotik kullanımıdır. Aşırı antibiyotik kullanımının, antibiyotiklere dirençli patojenleri artırma yönünde olumsuz etkileri mevcuttur. Birçok çalışmada antibiyotik kullanımı sonrası bakteriyel çeşitliliğin azaldığı gösterilmiştir. tedavisinden sonra normal mikrobiyota dengesinin tekrar sağlanması antibiyotiğin tipine ve spektrumuna bağlıdır. Antibiyotik tedavisinden sonra intestinal mikrobiyota yeniden şekillenirken, kommensal yabancı bakterilerin ya da dirençli türlerin kolonizasyonuna izin verebilir. Ayrıca antibiyotiklerin tekrar tekrar kullanımı, mikrobiyotayı antibiyotik dirençli genlerle rezervuar haline getirmektedir(83).

Fiziksel egzersizin bağırsak mikrobiyotasını düzenleyebileceği ve fiziksel aktivitenin mikrobiyotadaki faydalı türlerin sayısını arttırabileceği de başka bir çalışmada gösterilmiştir (84).

2.2.5. Disbiyozis ve Kalp Yetersizliği

İnflamatuvar ve metabolik mekanizmalar KKY'nin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynayabilir ve yeniden şekillenmeye katkıda bulunabilir. KY sonucu, bağırsakta meydana gelen konjesyonun bağırsak bariyerini değiştirdiği ve bu durumun da değişmiş bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (85). Bağırsak, sürekli trilyonlarca mikrobiyal antijene maruz kalmaktadır. Bu maruziyet, bağırsak bariyerinin sürekli olarak disfonksiyon riski altında olduğu bir ortam yaratır. Mikrobiyota doğrudan bağırsak bariyerini değiştirebilir. Bozulmuş bağırsak bariyer fonksiyonu nedeniyle bağırsak bakterilerin translokasyonu ve endotoksin benzeri bileşiklerin salınımı artmaktadır ve bunlar dolaşımda yüksek miktarda tespit edilmektedir. Bu duruma, inflamatuvar yanıt ve oksidatif streste artış eşlik etmektedir (85). Öte yandan bağırsak mikrobiyal metabolizmasının değişmesi sonucu meydana gelen bağırsak geçirgenliği, inflamasyon ve yağ birikimindeki artış metabolik bozukluklara neden olmakta ve konağın tüm metabolik sürecini etkilemektedir. KY, hayvan modeli çalışmalarında da artmış diyet kolininin miyokard fibrözisi, fonksiyonel bozukluğu ve pulmoner ödeme neden olacak şekilde kalbin yeniden şekillenmesi durumu (ventriküler remodelling) arasında direkt ilişki olduğu gösterilmiştir (86). Wang ve ark. yaptığı çalışmada ateroskleroza yatkın farelerde bağırsak mikrobiyotasının baskılanması; diyetle alınan kolinin arttırdığı ateroskleroza inhibe etmiştir. Bu verilere dayanarak artmış kolin ve kolin metabolitlerinin; artmış KVH riskini erken öngörebilmede potansiyel rolünün olduğu ileri sürülmüştür (87).

Konjesyonun intestinal bariyeri değiştirdiği ve bakteriyel translokasyonu potansiyel olarak kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Bu bulguların KKY progresyonunda bağırsak mikrobiyotasının katkısı hakkında önemli görüş sağlayacağı düşünülmektedir (88). Sandek ve arkadaşları sukraloz atılımı ile ölçülen kalın bağırsak geçirgenliğinde % 210' luk bir artış bildirmiştir. KY semptomlarının şiddeti, artmış bağırsak geçirgenliği, patojenik bakteri miktarı ve sekonder inflamasyon ile korelasyon göstermektedir (88).

Birçok çalışma, LPS gibi mikrobiyal ürünlerin sistemik dolaşıma geçişinin bağırsak duvarında meydana geldiğini göstermiştir. LPS, TLR' yi aktive ederek sistemik inflamasyona neden olabilir. LPS ile indüklenmiş TLR-4 aktivasyonu, TNF-alfa gibi enflamatuvar sitokinlerin salınımını indükler. Bu da baskılanmış mitokondriyal aktivite, bozulmuş kalsiyum homeostazisi ve kardiyomiyositlerde bozulmuş β -adrenerjik aktivite dahil olmak üzere birkaç yoldan kardiyak fonksiyonları baskılayıcı görevi görebilir. IL-1 ve IL-6 gibi diğer inflamatuvar sitokinler de miyokard disfonksiyonunu destekleyebilir. Bir çalışmada, antibiyotiklerle yapılan bağırsak dekontaminasyonunun, LPS' nin intestinal seviyelerini, LPS ko-reseptörü CD14'ün monosit ekspresyonunu ve IL-6, IL-1 β ve tümör nekroz faktörünün üretimini azalttığını

göstermiştir (89). Bununla birlikte, bağırsak mikrobiyotası, sistemik inflamatuvar ve metabolik bozukluklar ile KKY hastalarında miyokardiyal fonksiyon arasındaki ilişkinin bilinmemesi, sınırlı kalmaktadır ve bağırsak sızıntısından ziyade diğer mekanizmalar, rahatsız edici bir bağırsak mikrobiyotasının, sistemik inflamatuvar ve metabolik yolların aktivasyonuna dönüştürülmesinde rol oynayabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gönüllü Seçimi ve Hastaların Gruplandırılması

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 18 / 04 / 2017 tarih ve 2017 / 06 sayılı kararıyla uygun görülmüştür. Bu araştırmaya Şubat 2018- Aralık 2018 tarihleri arasında kalp yetersizliği tanısıyla Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kardiyoloji Polikliniğine ayaktan başvuran 40-75 yaş arası, ekokardiyografide modifiye simpson metodu ile ejeksiyon fraksiyonu < %40 semptomatik kronik kalp yetersizliği olan 19 hasta ile ejeksiyon fraksiyonu \geq %40 olan 21 sağlıklı gönüllü, bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alınarak dâhil edildi. Çalışmaya klinik olarak aktif enfeksiyon belirtileri olanlar, kronik inflamatuvar hastalık tanısı olanlar, malignite, böbrek yetmezliği veya renal transplantasyon yapılmış olanlar, gastrointestinal cerrahi öyküsü olan ve başvurudan önceki 2 ay içerisinde antibiyotik, probiyotik, steroid veya immünosüpresif tedavi alan hastalar dâhil edilmedi. Hastaların kan serumundan hs-CRP, galaktin-3, IL-1, IL-6, TNF-Alfa, Lipopolisakkarit, endotoksin, NT-proBNP parametreleri çalışıldı. Ayrıca kültürden bağımsız yöntemlerle; polimeraz zincir reaksiyonu-denatüre gradient jel elektroforezi (PZR-DGGE) ve metagenomiks yaklaşımı ile hastalardan toplanan dışkı örneklerindeki mikrobiyal çeşitlilik belirlendi.

3.2 Hasta Numunelerinin Alınması, Saklanması

Şubat 2018 tarihinden itibaren katılımcılardan TLR4 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için 1 adet antikoagülan (K₂EDTA) içeren tam kan ve serumda hs-CRP, galaktin-3, IL-1, IL-6, TNF-Alfa, Lipopolisakkarit, endotoksin, NT-proBNP analizleri için 1 adet antikoagülan içermeyen kan örnekleri alındı. Tam kan örnekleri 2500 devirde 10 dakika süreyle RBC buffer eklenerek santrifüj edilerek plazma ve eritrosit olarak ayrıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı ve eritrositler tamamen uzaklaştırıldı. Santrifügasyon sonucu pelet kısmında yer alan lökositler 500 µl trizol içine alınarak -20 °C'de muhafaza edildi. Serum örnekleri de kanlar 2500 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilerek elde edildi ve analiz zamanına kadar -20 °C'de dondurularak saklandı. Katılımcılardan dışkı örnekleri taze olarak toplandı ve +4°C'de anaerobik koşullar altında laboratuvara ulaştırıldı. Dışkı numuneleri % 20 gliserol içeren fosfat tamponlu salin içinde sıvı

azot ile donduruldu ve kullanılabildiği kadar -80 ° C'de saklandı. Dışkı örneklerinden bakteriyel DNA, lizozim ve akromopeptidaz kullanılarak enzimatik lizis yöntemi ile ekstre edildi.

3.3 Ölçüm Yöntemleri

3.3.1. RNA İzolasyonu

TLR 4 geninin mRNA düzeyinde kontrol ve hasta grubu arasındaki ekspresyon değişimini araştırmak için Real-Time PCR çalışması ve öncesinde RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen örneklerden RNA izolasyonu için Trizol ile RNA eldesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirilmesi için çekirdekli kan hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Öncelikli olarak 2 ml kandan, RBC Lizis Buffer (89,9 g NH₄Cl; 10 g KHCO₃, 2 ml 0,5 M EDTA) yardımıyla 25000 rpm de 3 kez santrifüj edilerek çekirdeksiz kan hücreleri patlatılıp çekirdekli kan hücreleri olan akyuvarlar izole edilmiş ve 500µl trizol ile çözülüp aşağıdaki Trizol ile RNA izolasyonu protokolü uygulanmıştır.

Homojenat 1 ml'lik ependorf tüplere alınmış ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmış ve ardından her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.

Daha sonra +4°C' de 15.000 g'de 20 dk santrifüj edilmiş ve renksiz olan üst faz toplanmış, ayrı ependorf tüplere alınmıştır. Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklenip, pipetlenecek ve 10 dk oda sıcaklığında beklenmiştir.

+4°C' de 15.000 g'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dikkatlice atılıp peletin üzerine %70'lik etanol konulmuş ve +4°C' de 12.000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra tekrar süpernatant atılıp, pellet kısa bir süre hava ile kurutulmuştur. Son olarak pellet 40 µl RNase-DNase free su ile çözülmüştür.

Elde edilen örnekler RT-PCR analizi için hazır hale getirilmiştir. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo, USA) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işlemi; 1µl RNase free su ile Nanodrop cihaz kasesi üzerine bir damla halinde pipetlenmiş ve bilgisayardaki program analizi ile körleme işlemi yapılmıştır. Daha sonra ilgili RNA örneklerinden 1µl alınarak, cihazın RNA ölçüm programı seçilmiş ve konsantrasyonları ölçülmüştür. Takiben cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Cat No: 05 081 955 001, Roche, Almanya) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım prosedürü Tablo 1'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 50°C'de 1 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) işlemine kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	2µg
Oligo(dT) Primer	1µl	2,5 µM
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl	500 µM
5X RT tamponu	4 µl	1X
DTT	1 µl	5mM
Protector RNase Inhibitör	0,5 µl	20 U
Easyscript plus RTase (200U/µL)	1 µl	200 ünite
RNAaz içermeyen su	Değişken	
Son hacim	20 µl	

Tablo 1. cDNA Sentez Karışımı

3.3.3. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PZR) İle mRNA Ekspresyon Değişiminin

Belirlenmesi

Gerçek-zamanlı PCR işleminde, "TLR4" geninin mRNA düzeyindeki gen ekspresyonu değişimi araştırılmıştır Bunun için housekeeping gen olan Beta-aktin geni çalışmamızda kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlere ait Reverse ve Forward dizileri Tablo: 2 de verilmiştir. Reaksiyon aşamasında, her bir kuyucuk başına "5 µl SYBR Green" (Applied Biosystem, USA), "6.5 µl moleküler biyolojik saflıkta su", "1.5 µl cDNA", "1 µl Forward Primer" ve "1 µl Reverse Primer" kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımları 96-kuyucuklu plakaya aktarılmış ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle kapatılmıştır. StepOne Plus gerçek-zamanlı PCR cihazına yüklenen plaka, 95°C'de 10

dk, 40 döngü olacak şekilde 95°C’de 15 sn ve 60°C’de 10 dk olacak şekilde amplifiye edilmiştir.

	GEN İSMİ	PRİMER DİZİ
1.	Beta-aktin	F: TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC R: CTGCTTGCTGATCCACATCTG
2.	TLR4	F: CCCTGAGGCATTTAGGCAGCTA R: AGGTAGAGAGGTGGCTTAGGCT

Tablo 2. Çalışmamızda kullanılan genlerin forward ve reverse primer dizileri.

3.3.4. Eliza Deneyleri

Biyokimya tüpünden 2500 rpm de santrifüj edilerek elde edilen serum örnekleri TNF-alfa, IL-1 beta, endotoksin, CRP, Galektin-3, IL-6,LBP (Lipopolisakkarit Binding Protein), NT-proBNP, olmak üzere 8 adet Eliza testi için hazır hale getirilerek -20°C’de tutularak teste hazır halde bekletilmiştir.

Eliza deneyleri üretici firma olan Elabscience (USA)’ın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Protokol basamakları aşağıdaki gibidir.

1. 100 µl standart veya örnekler kuyuculara koyularak 90 dakika 37°C’de inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra sıvılar uzaklaştırıldı. 100 µl Biotinylated detection Ab. eklendi. 1 saat 37°C’de inkübe edilir.
3. İnkübasyon sonrasında aspirasyon ve 3 defa yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapıldı.
4. 100 µl HRP conjugate eklendi. 30 dakika 37°C’de inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında aspirasyon ve 5 defa yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapıldı.
6. 90 µl Substrate reagent eklendi. 15 dakika 37°C’de inkübe edildi.
7. 50 µl Stop solüsyonu eklenir. 450 nm de mikropilaka okuyucu cihazı (Eliza, Heales, Çin) ile okuma işlemi yapıldı.
8. Sonuçlar hesaplanmış ve analize alınmıştır.

3.3.5. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Verilerin analizi $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak bilgisayar programı ile kantitasyonu yapılmıştır. Web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis“ programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanıldı. Metodun amacı, iki ekspresyon sonucunun $\pm 3SD$ karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle, gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlendi. Grupların

karşılaştırılması “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programında bulunan “Student t-testi” analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.3.6. Katılımcıların Bağırsak Mikroflorasının Belirlenmesi

Hastalardan toplanan gaytalardaki mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi kültürden bağımsız yöntemlerle; PZR-DGGE ve metagenomik yaklaşımı ile belirlendi.

PZR-DGGE analizinde, mikroorganizmaların ayırımı için %25-50 üre-formamid içeren gradient poliakrilamid jel kullanıldı. Bu oranlardaki poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılan temel bileşenlerin 100 ml’si için kullanılan miktarlar Tablo 4’de verilmiştir.

Bileşenler	Denatüre Çözeltinin Oranları			
	%25	%30	%50	%60
%40 Akrilamid/Bis (37.5:1) (ml)	20	20	20	20
50*TAE Tampon (l)	2	2	2	2
Formadid (ml)	10	12	20	24
Üre (g)	10,5	12,6	21	25,2
Steril Saf Su (ml)	57,5	53,4	37	28,8
Toplam Hacim (ml)	100	100	100	100

Tablo 3. PZR-DGGE analizinde denatüre çözeltinin hazırlanmasında kullanılan temel bileşenler ve oranları.

Tablo 4’de belirtilen bileşenler kullanılarak 100 ml olarak hazırlanan çözeltinin jelleşmesi için çözeltiliye 0,1g/ml’lik Amonyum Persülfat’dan (APS) 815 µl ve diğer jelleşme ajanı olan TEMED’den de 63 µl ilave edilecek ve hızla karışım gradient poliakrilamid jel hazırlanma sisteminin (Gradient Former Bio Rad) haznesine yüklendi. Polimerleşen jeller +4°C’de bir gece bekletildikten sonra sıcaklık kontrollü dikey elektroforez (Thermo) sisteminde kullanıldı. Gaytadan bakteriyel DNA’nın izolasyonu için 10 g gayta örneği 90 ml peptonlu fizyolojik suda iyice homojenize edilecek, takiben bu homjenizattan 50 ml alınarak 1000 g’de 5 dk santrifüj

edildi. Oluşan süpernatant başka bir tüpe alınacak ve 5000 g'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanarak üst faz uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre pelletleri yıkanarak genomik DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen) ile genomik DNA elde edildi.

PZR-DGGE analizinde bakterilerin ribozomunun V3 bölgesi çoğaltılacak ve nükleotit farklılıkları jelde incelenecektir. Bu amaçla bakteri hücrelerin ribozomal bölgesine homolog olan F338 ön primeri (5-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 3' terminal ucuna GC DNA kıskacı (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGG-3') takılarak ve 518R geri yöndeki primer (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') ile birlikte kullanıldı.

PZR karışımının hazırlanmasında master mix'den (5*FIREPol[®] Master Mix/ SOLIS Bio Dyne) 8 µl, primerlerden 1 µl, DNA'dan 2µl kullanılacak toplam hacim 40 µl olacak şekilde steril ultra su ile tamamlandı. Bakteriler için uygulanan PZR programında; 95 °C 5 dk ön denatürasyon, 30 çevrim 95 °C 30 sn, 55 °C 45 sn, 72 °C 1 dk ve son olarak 72 °C 10 dk program uygulandı. 16S rDNA PZR ürünleri sırasıyla %25-50 denatürant (7M üre ve %40 formadit) içeren % 8'lik poliakrilamid jel de 15 dk 50 V ve 4 saat 150 V akımda 60°C sıcaklıkta yürütüldü. Jeller son aşamada Ethidium Bromide (50 µl/1000 ml) ile boyanarak UV altında görüntülenecektir. Jel üzerindeki bantların değerlendirilmesi aynı jel üzerindeki referans suşların bantları ile kıyaslandı.

Metagenomiks çalışması için gaytadan DNA izolasyonu yapıldı. İlgilenilen gen bölgesi, bölgelerine özel universal primer dizileri kullanıldı. Primerlerde NGS indeks bölgelerine bağlanması için adaptör dizileri bulunacaktır. Kütüphane hazırlığı tamamlandıktan sonra, NGS okumasında "Sequencing by synthesis" prensipiyle, her yeni dNTP eklendiğinde, o eklenen bazın floresan ışınması optik olarak gözlemlenip kaydedildi. PCR ürünlerindeki adaptör bölgeler okumanın yapıldığı flow cell üzerinde bulunan oligo dizilerini tamamlayıcı dizilere sahiptir ve böylece bu bölgeler birbirini tanıır.

3.3.7. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Parametrik ve nonparametrik verilerin istatistik analizinde Minitab (Ver 18.1, ABD) programı kullanıldı. Mikrobiyata analizleri R (Ver 3.5.0, GPL-3 lisans) programı ile yapıldı. Mikrobiyal çeşitlilik Alem (Kingdom), Şube (Phylum), Sınıf (Class), Takım (Ordo), Aile (Family), Cins (Genus) ve Tür (Species) seviyesinde değerlendirildi. Her bir örnekteki mikrobiyal toplulukların zenginliği ve çeşitliliği sırasıyla Chao1 tahmini operational taxonomic units (OTU) sayısı ve Shannon endeksi ile değerlendirildi. P < 0.05 olan değerler istatistiksel anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Katılımcıların Özellikleri

Çalışmaya katılan hasta ve gönüllülerin demografik özellikleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

		KKY hastaları (n= 19)	Kontrol (n=21)	p-değeri
Cinsiyet	Erkek	17 (%89)	19 (%90)	1,000
	Kadın	2 (%11)	2 (%10)	1,000
Yaş (yıl)		56,38 (7,86)	54,76 (7,60)	0,516
BMI (kg/m ²)		29,03 (2,62)	30,11 (2,46)	0,196
Sigara		8 (%44)	6 (%28)	0,487
HT		4(%22)	4 (%19)	1,000
DM		0(%0)	0 (%0)	-
HL		1(%5)	1 (%4,7)	1,000
KAH		13(%72)	18 (%85,7)	0,432
LVEF (%)		31,4 (8,25)	55,2 (10,00)	<0,001
Medikasyon	Aspirin	17 (%94)	20 (%95,2)	1,000
	P ₂ Y ₁₂ inh.	7 (%38)	17 (%80,9)	0,018
	B bloker	15(%83)	20(%95,2)	0,318
	Statin	11(%61)	19 (%90,4)	0,055
	ACEI/ARB	15(%83)	11 (%52,3)	0,088
	PPI	13 (%72)	13 (%61,9)	0,733
	Spirolakton	10 (%55)	0 (%0)	<0,001
HDL kolesterol (mg/dL)		38,33 (9,92)	37,00 (7,30)	0,633
LDL kolesterol (mg/dL)		99,38 (37,51)	91,47 (31,53)	0,479
Trigliserid (mg/dL)		160,16 (56,06)	160,38 (37,74)	0,989
Total kolesterol (mg/dL)		156 (71,75)	157 (42)	0,955
Kreatinin (mg/dL)		0,99 (0,17)	0,88 (0,26)	0,114
Glukoz (mg/dL)		94 (10,50)	98 (19,00)	0,053
TSH (mIU/L)		1,51 (1,15)	1,60 (1,32)	0,826
WBC (/µl)		9,87 (4,47)	8,62 (2,74)	0,294
Hemoglobin (g/dL)		13,41 (1,58)	14,24 (1,33)	0,086

Tablo 4: Katılımcıların özellikleri

4.2. Çalışmaya katılan hasta ve sağlıklı gönüllülerde ölçülen parametrelerin incelenmesi

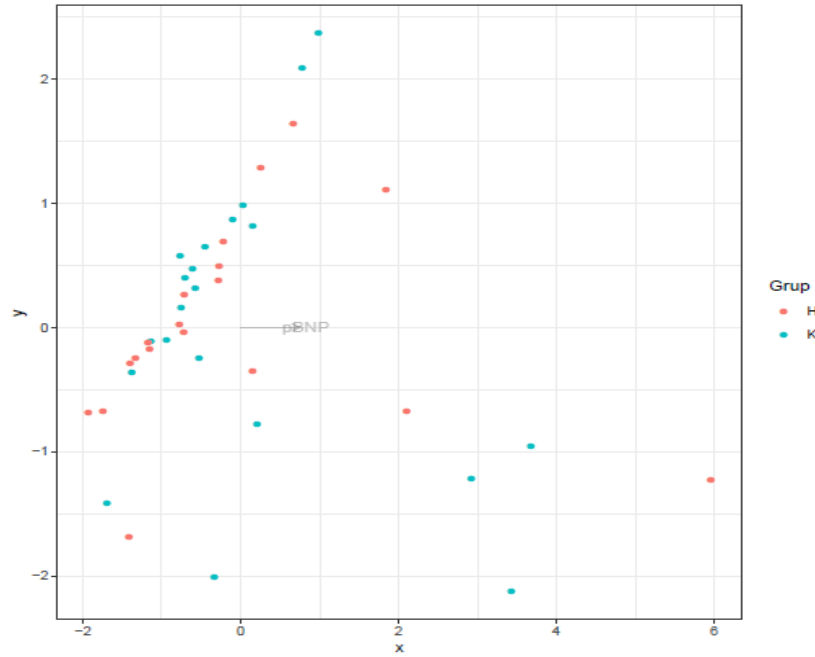
Hasta ve gönüllüler kan inflamasyon marker düzeylerine göre karşılaştırıldığında iki grup arasında IL-1B, TNF- α ve CRP düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı.

	Genel N:40	Hasta N:19	Kontrol N:21	P-değeri
Gal-3 (ng/ml)	7,39	7,34	7,44	0,89
IL-1B (pg/ml)	1,49	1,52	1,47	<0,05
IL-6 (pg/ml)	2,37	2,37	2,50	0,76
CRP (ng/ml)	6,22	6,78	5,60	<0,05
Endotoksin (EU/L)	6,56	6,54	6,58	0,56
LBP (ng/ml)	12,01	12,23	11,81	0,91
TNF- α (pg/ml)	1,99	2,39	1,63	<0,01
pBNP (ng/ml)	11,54	12,21	10,94	0,82

Tablo 5: İnflamatuvar markerların her iki grupta ve toplamdaki ortalama değerleri

4.2. İnflamasyon marker düzeyleri ile mikrobiyal çeşitlilik arasındaki ilişkinin incelenmesi

Filum seviyesinde yapılan Kruskal Wallis testine göre; Gal-3 (ng/ml) (p= 0,46), IL-1B (pg/ml) (p= 0,67), IL-6 (pg/ml) (p= 0,13), CRP (ng/ml) (p= 0,24), Endotoksin (EU/L) (p= 0,33), LBP (ng/ml) (p= 0,11), TNF- α (pg/ml) (p= 0,48) saptanmış olup inflamasyon marker düzeylerinin mikrobiyal zenginlik ve çeşitlilik arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. Non-metrik incelemede ise sadece pBNP (ng/ml) (p=0,05) düzeyi anlamlı bulundu.



Şekil 4: pBNP (ng/ml) düzeyi ile mikrobiyota alfa çeşitlilik arasındaki ilişki

4.3 Kalp yetersizliği ve sağlıklı kontrol grubunda gut mikrobiyotanın incelenmesi

19 kalp yetersizliği ve 21 kontrol grubu hastasının dış örneklerinden 16S rRNA gen dizilimi yapıldı. Her bir örnekteki mikrobiyal toplulukların çeşitliliği ve zenginliği Chao1 tahmini OTU sayısı ve Shannon indeksi ile değerlendirildi. Gut mikrobiyotanın zenginliği ve çeşitliliği KY grubu ile kontrol grubu arasında benzerdi (Resim 1).

Ağırlıksız UniFrac, her taksonun varlığında veya yokluğunda bireyler arası farklılıkları yansıtan niteliksel bir ölçümdür. Ağırlıklı UniFrac, her taksonun göreceli bolluğundaki bireyler arası farklılıkları yansıtan nicel bir ölçüdür. UniFrac analiz ile bireylerden alınan dışkı örnekleri arasındaki tahmini mesafeler hesaplandı. Bireylerin bağırsak mikrobiyal toplulukları arasındaki UniFrac mesafeleri, Principal Coordinate Analysis (PCoA) bireylerinin oluşturduğu bir dağılım grafiği ile görselleştirildi. Resim 1E' de bireylerin bağırsak mikrobiyal toplulukları arasındaki UniFrac mesafenin Principal Coordinate Analysis (PCoA) tabloları sunulmuştur.

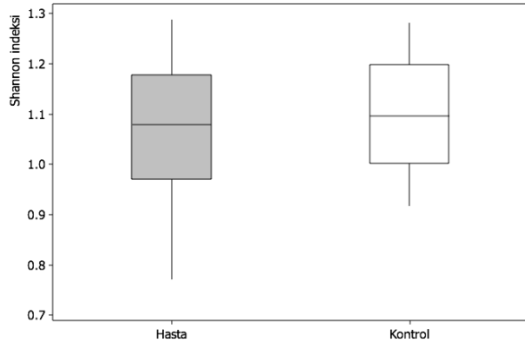
Kalp yetersizliği hastalarının bağırsak mikrobiyal topluluklarının spesifik taksonomi gruplarında anlamlı değişiklik olup olmadığını araştırmak için, her bir şube, aile, cinse veya türe atanmış 16S rRNA sonuçlarının göreceli doygunluğunu analiz ettik.

Bağırsak mikrobiyotasının çoğunluğuna Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria ve Proteobacteria olmak üzere 4 filum hâkimdir. Kontrol grubu ve KKY hastalarından alınan numuneler arasında, filum seviyesinde göreceli doygunluk bakımından önemli farklılıklar gözlenmedi.

Aile seviyesinde yapılan taksonomik inceleme, KKY hastalarının bağırsak mikrobiyotasındaki **Flammeovirgaceae**, **Pseudonocardiaceae**, **Promicromonosporaceae**' nin kontrol grubuna göre daha fazla miktarda olduğunu göstermiştir. (Resim 2A,2B,2C) Cins düzeyinde yapılan taksonomik incelemede **Enterococcus**' un KKY grubunda kontrol grubuna göre daha fazla miktarda olduğu saptandı (Resim 2F). Tür düzeyinde, KKY hastalarından alınan örneklerde kontrol grubuna göre **Lactobacillus letivazi**'nin anlamlı olarak arttığı görüldü (Resim 2G). Ayrıca hem cins düzeyinde hem tür düzeyinde KKY hastalarında kontrol grubuna göre bazı bakteri türleri anlamlı olarak daha az saptanmıştır. (Tablo 6)

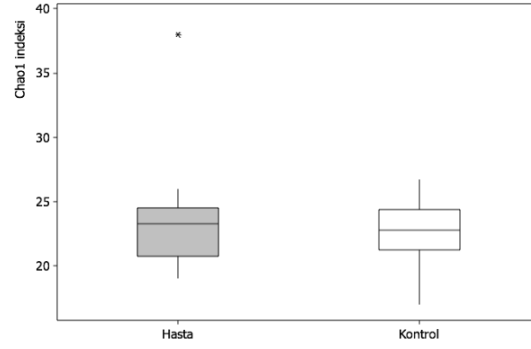
A.

Şube (Phylum) seviyesi:



Shannon p=0.496

Grup	N	Mean	St Dev	SE Mean
Hasta	19	1.070	0.136	0.031
Kontrol	21	1.098	0.117	0.026

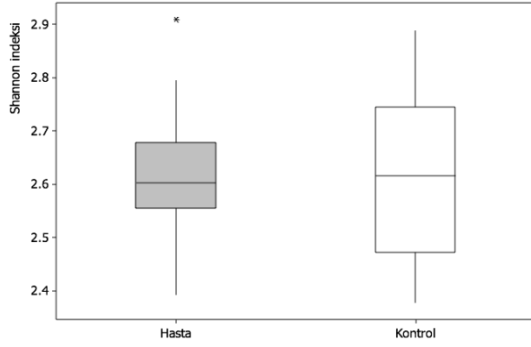


Chao1 p=0.471

Grup	N	Mean	StDev	SE Mean
Hasta	19	23.42	4.08	0.94
Kontrol	21	22.63	2.57	0.56

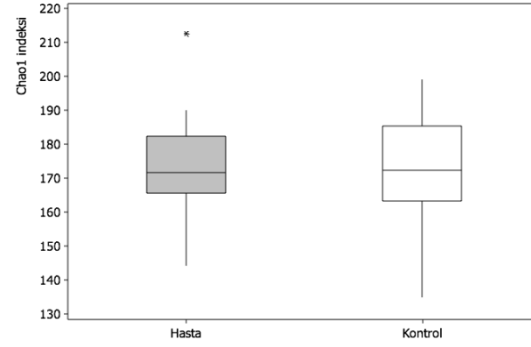
B.

Aile (Family) seviyesi:



Shannon p=0.768

Grup	N	Mean	StDev	SE Mean
Hasta	19	2.607	0.126	0.029
Kontrol	21	2.620	0.150	0.033

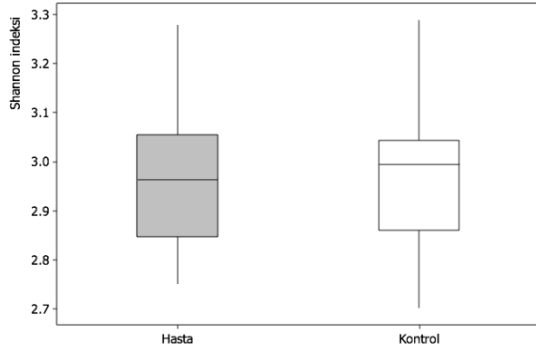


Chao1 p=0.833

Grup	N	Mean	StDev	SE Mean
Hasta	19	174.0	15.2	3.5
Kontrol	21	173.0	16.6	3.6

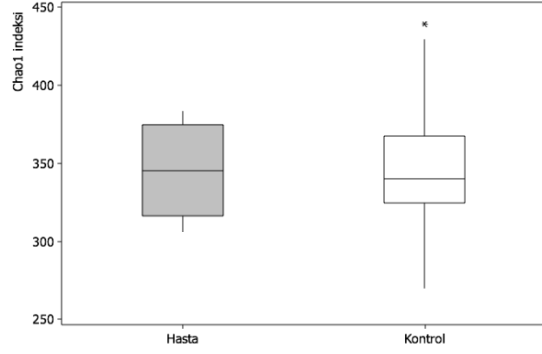
C.

Cins (Genus) seviyesi:



Shannon p=0.648

Grup	N	Mean	StDev	SE Mean
Hasta	19	2.960	0.134	0.031
Kontrol	21	2.981	0.154	0.034

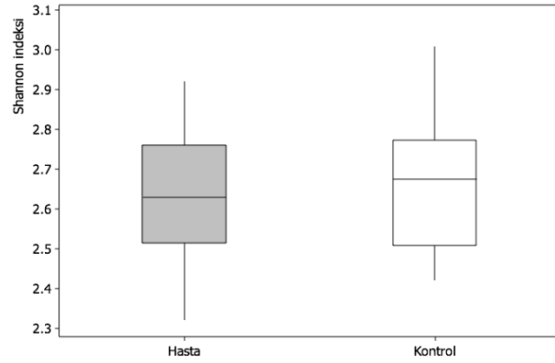


Chao1 p=0.887

Grup	N	Mean	StDev	SE Mean
Hasta	19	347.0	28.4	6.5
Kontrol	21	345.3	42.1	9.2

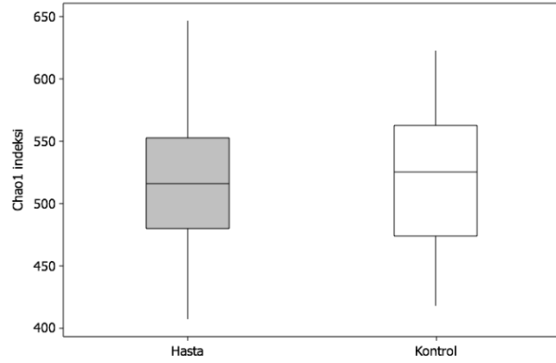
D.

Tür (Species) seviyesi:



Shannon p=0.481

Grup	N	Mean	StDev	SE Mean
Hasta	19	2.619	0.161	0.037
Kontrol	21	2.655	0.166	0.036

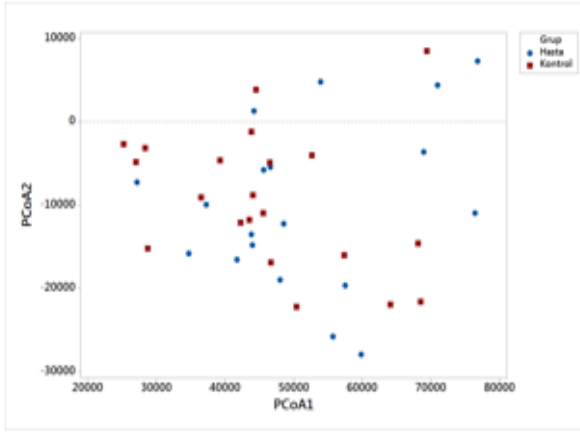


Chao1 p=0.857

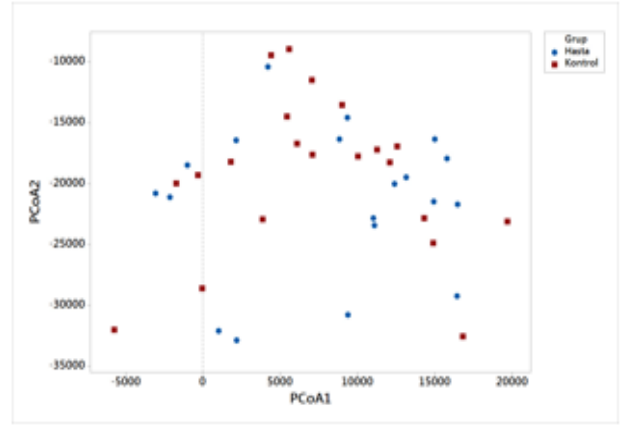
Grup	N	Mean	StDev	Mean
Hasta	19	517.2	59.3	14
Kontrol	21	520.5	55.6	12

E.

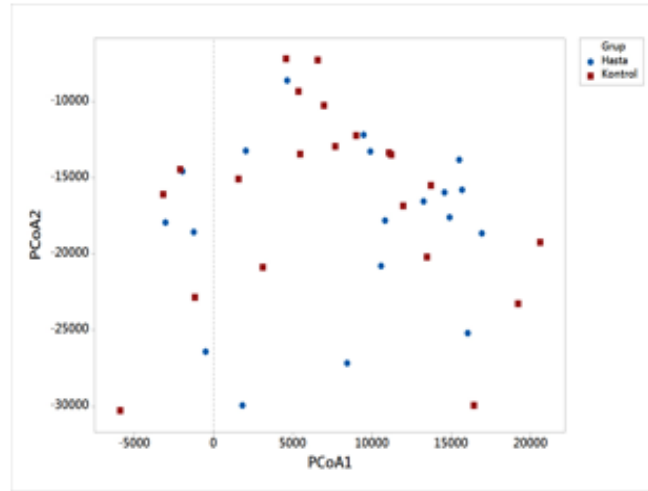
Şube (Phylum) seviyesi için PCoA;



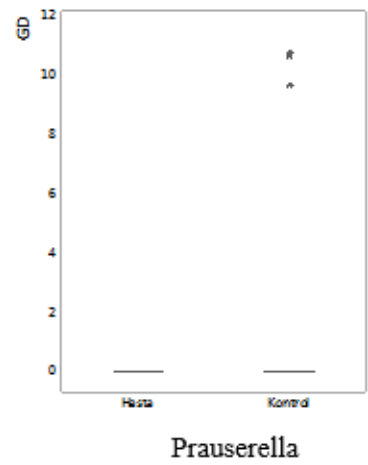
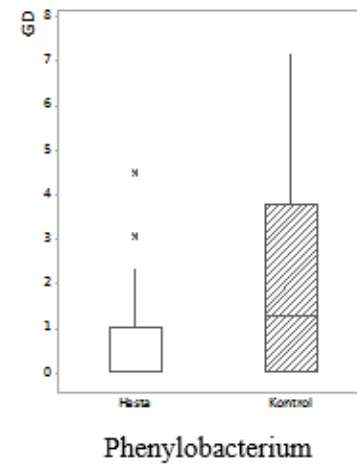
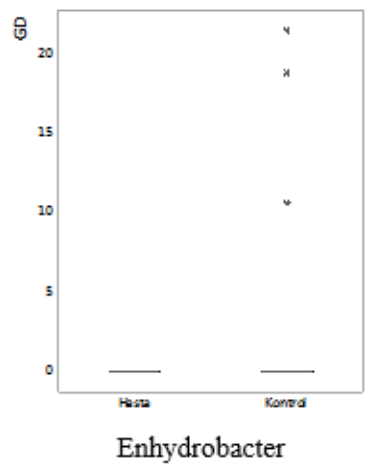
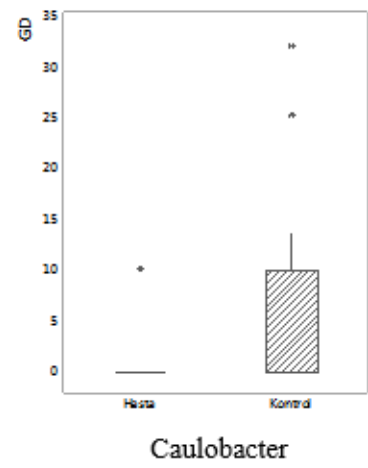
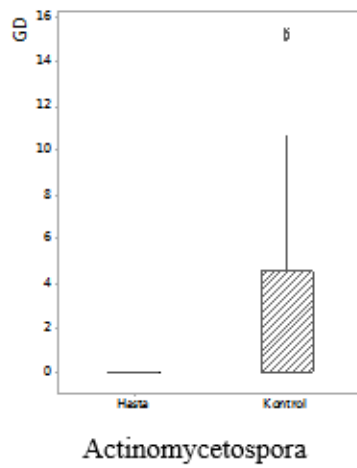
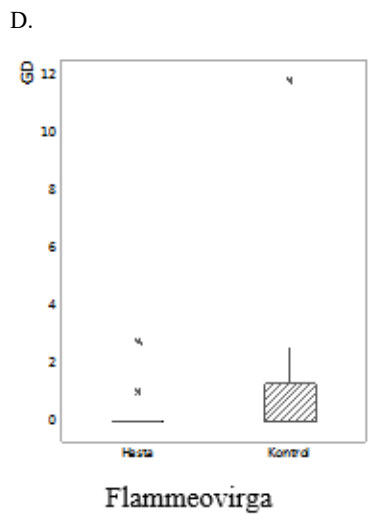
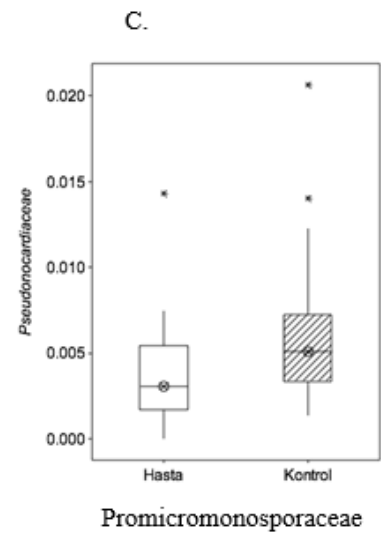
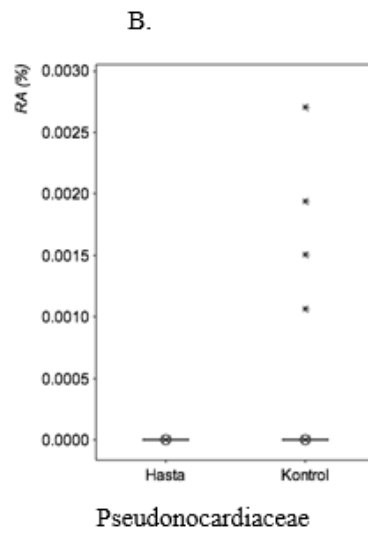
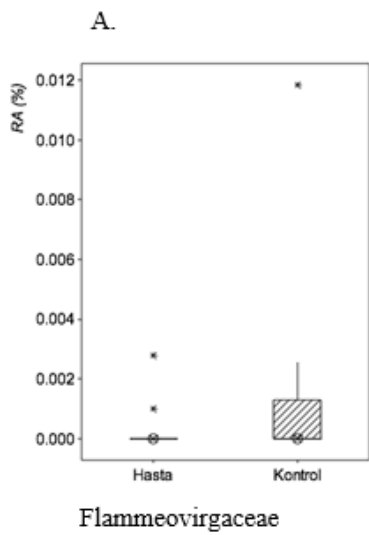
Aile (Family) seviyesi için PCoA;



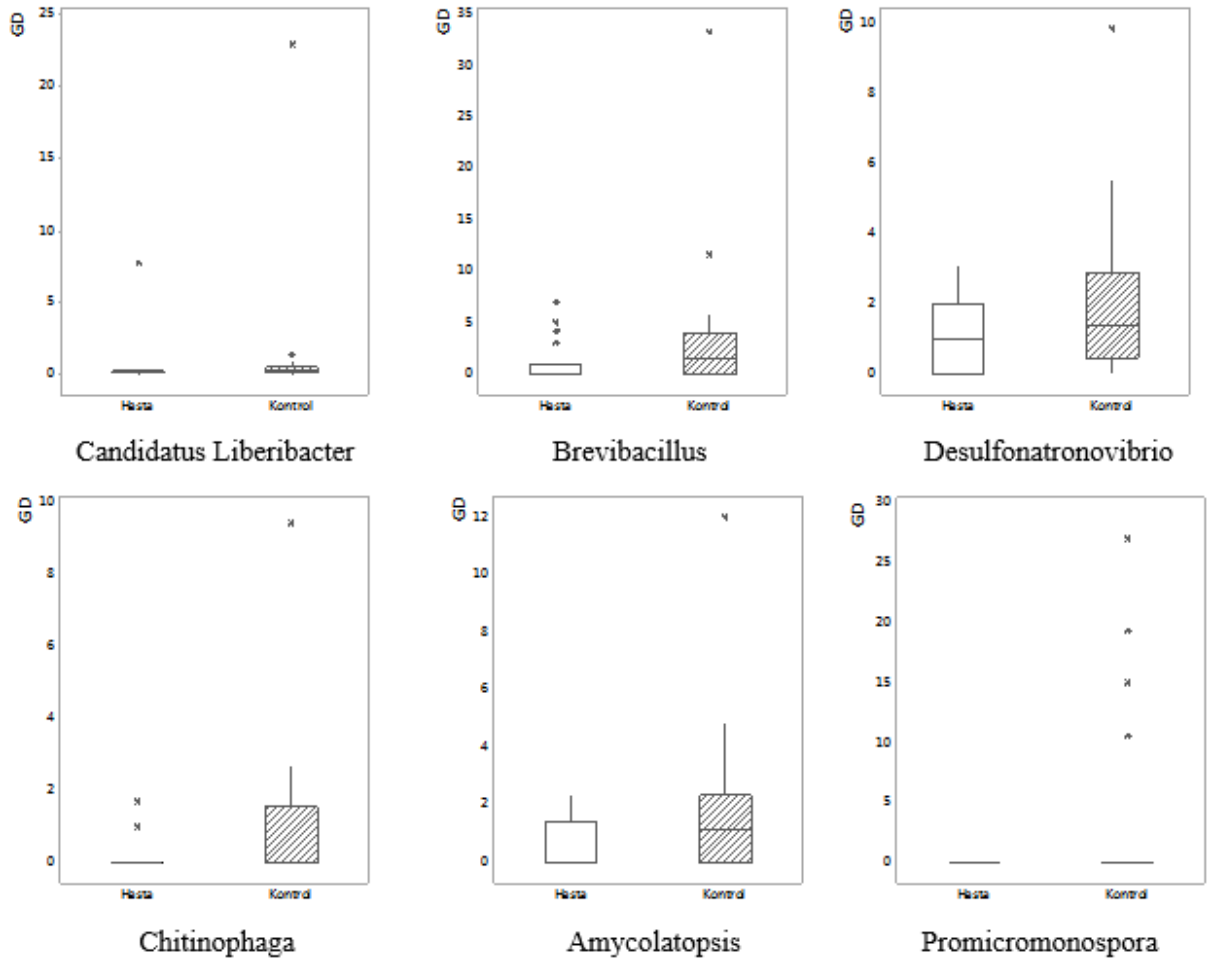
Cins (Genus) seviyesi için PCoA;



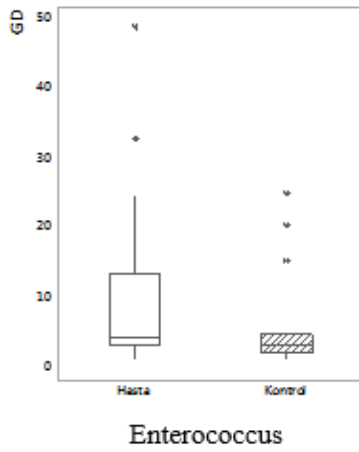
Resim 1: Chao1-tahmini OTU sayısı ve Shannon indeksi (A, B, C, D) KY hastalarından ve sağlıklı kontrol deneklerinden elde edilen bağırsak mikrobiyotaya örnekleri. Bireylerin bağırsak mikrobiyal toplulukları arasındaki UniFrac mesafenin Principal Coordinate Analysis'i (PCoA) (E)



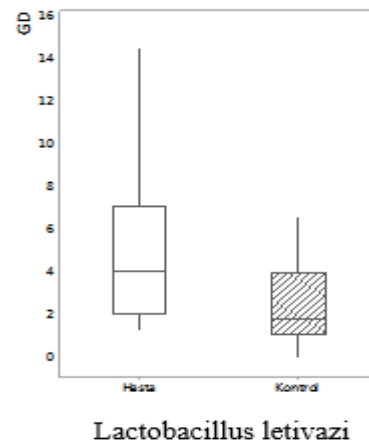
E.



F.



G.



Resim 2; Grafik ordinarları; RA (%): Göreceli doynunluk (Relative abundance) KY hastalarından ve kontrol deneklerinden elde edilen gut mikrobiyota örneklerinde taksonun göreceli doynunluğu. (A, B, C) Aile seviyesi. (D, E, F) Cins seviyesi. (G) Tür

SEVİYE	Hasta Grubu	P değeri	Kontrol Grubu	P değeri
ŞUBE	-	-	-	-
AİLE			Flammeovirgaceae Pseudonocardiaceae Promicromonosporaceae	0.01 0.02 0.04
CİNS	Enterococcus	0.03	Flammeovirga Actinomycetospira Caulobacter Enhydrobacter Phenylobacterium Prauserella Candidatus Liberibacter Brevibacillus Chitinophaga Amycolatopsis Desulfonatronovibrio Promicromonospora	0.01 0.01 0.01 0.02 0.02 0.02 0.03 0.03 0.04 0.04 0.04 0.04
TÜR	Lactobacillus letivazi	0.008	Providencia burhodogranaria Bifidobacterium angulatum Bifidobacterium gallicum Peptoniphilus gorbachii Anoxybacillus ayderensis Flammeovirga pacifica Amycolatopsis methanolica Lactobacillus ruminis Leuconostoc citreum Lysobacter deserti Bifidobacterium cuniculi Erysipelothrix inopinata Lactobacillus hayakitensis Chitinophaga ginsengisoli Enhydrobacter aerosaccus Myroides injenensis Bifidobacterium scardovii Clostridium papyrosolvens Bacteroides fragilis Bifidobacterium indicum Roseomonas terpenica Bifidobacterium subtile Turcibacter sanguinis Methanobrevibacter acididurans	0.002 0.003 0.004 0.004 0.007 0.011 0.012 0.015 0.017 0.019 0.020 0.023 0.023 0.025 0.027 0.027 0.031 0.033 0.035 0.035 0.040 0.043 0.046 0.049

Tablo 6 : Hasta ve kontrol grubunda yüksek saptanan mikroorganizmalar

5. TARTIŞMA

Dünyada, giderek büyüyen en önemli sağlık problemlerinden biri KKY' dir (90). KKY ile anlayışımız, seneler içerisinde sadece bir pompa yetersizliğinin yol açtığı bir hastalıktan, birçok nörohormonal ve immun sistemin de patofizyolojisine dâhil olduğu oldukça karmaşık bir hastalık olduğu şeklinde değişmiştir.(91). Başlangıçta kompanzasyon amacı ile aktive olan bu nörohormonal ve inflamatuvar sistemler, kronik dönemde ventrikül fonksiyonlarını bozarak ve ventrikül yeniden biçimlenmesine neden olarak hastalığın ilerlemesine katkıda bulunurlar (91). Bu sistemlere yönelik geliştirilen birçok ilaca rağmen, KKY halen oldukça morbid ve mortal bir hastalık olarak değerlendirilmektedir. Bu durum, KKY patofizyolojisine katkıda bulunan diğer mekanizmaların da araştırılmasının önemini göstermektedir.

İnsan bağırsağı, bağırsak mikrobiyotasını oluşturan geniş ve karmaşık bir mikrobiyal hücre topluluğu barındırır. Bağırsak mikrobiyomu olarak adlandırılan bağırsak mikrobiyotasının mikrobik genomu, insan genomundan 100 kat daha büyüktür. Bağırsak mikrobiyotası, diyet liflerinin fermentasyonu, çeşitli besinlerin ekstraksiyonu ve bazı vitaminlerin sentezi, patojen kolonizasyonuna karşı bariyer oluşturma, intestinal epitel ve immun sistemini olgunlaştırma (maturasyon), gastrointestinal hormon sentezinin ve intestinal sinir sisteminin modülasyonu gibi fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, konak genotipi ve çevresel faktörlerin etkisiyle şekillenen bu mikrobiyotanın konfigürasyon ve aktivitesi, yine konak biyolojisini çeşitli yollarla etkileyebilir (92).

Belli bir dengede faydalı ve zararlı bakterileri içeren florada dengenin bozulmasıyla başlayan patolojik süreç, mikrobiyal disbiyozis olarak adlandırılmaktadır. Patojenik etkileri olan bakterilerin arttığı disbiyozisde, bağırsak rezistansında azalır ve geçirgenliği artar. Sülfat tüketen bakterilerin baskın hale gelmesiyle intestinal epitelde hasara yol açan hidrojen sülfid üretimi artar. Diğer taraftan toksin üreten Clostridium türleri, immun modülatör etkileri ve IL-10 üretimini arttırarak tetikledikleri inflamasyonla bağırsak hastalıklarının gelişimine zemin hazırlarlar (93-94).

Birçok patojenik bakterinin yukarıda anlatılan ve benzeri etkilerinin yanısıra yaşlanma, antibiyotik kullanımı, "batı tipi diyet" (yüksek yağ, yüksek şeker) ve beslenme alışkanlığındaki değişikliklerin disbiyozise ve bağışıklık sisteminin kronik aktivasyonuna neden olabilecekleri düşünülmektedir (95). Kronik inflamasyonda da TNF-a, IL-6 ve CPR gibi pro-enflamatuvar mediatör seviyeleri yüksektir (93). Kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, tip 2 diyabet, romatoid artrit gibi kronik inflamasyonla ilişkili hastalıkların bağırsak disbiyozisi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (96).

Aterosklerotik KAH, çok sayıda genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen kompleks bir hastalıktır. KAH, aterosklerotik plak oluşumuna bağlı olarak koroner arterlerin darlığı ile karakterize inflamatuvar bir hastalıktır. Mikrobiyota ile KVH arasındaki ilişki gittikçe daha fazla ilgi çekmektedir. Bağırsak mikrobiyotası, yaşam tarzı, diyet, genetik özellikler ve metabolik değişiklikleri içeren birçok faktörle ilişkilendirilmiştir. Konakçı ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim yavaş ilerleyen aterosklerozda temel faktördür. Mikrobiyotanın; bağışıklık sistemini aktive etmesi, kolesterol metabolizmasına olan etkileri ve TMAO gibi pro-aterojenik metabolitlerin üretilmesi yoluyla plak gelişimini tetikleyerek aterosklerozu etkilediği düşünülmektedir (97). TMAO ile ateroskleroz ilişkisini araştıran bir çalışmada; bağırsak mikrobiyotasının fosfotidilkolin metabolizmasına katılarak TMAO oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yüksek plazma TMAO düzeyi ile geleneksel risk faktörlerinden bağımsız olarak meydana gelen ana kardiyovasküler olay riski artışı arasında korelasyon saptanmıştır (15). KAH ile mikrobiyota ilişkisini araştıran birçok çalışma mevcuttur. Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bakteriyel hastalıklar ve KAH arasındaki ilişkiyi desteklemektedir, ancak ikisi arasında nedensel bir bağlantı olduğunu kanıtlayamamıştır (15).

Koroner kalp hastalığında bağırsak mikrobiyotasının rolünü araştıran ve koroner arter hastalığı olan 29 hasta ile 35 sağlıklı gönüllünün dâhil edildiği bir çalışmada; filum düzeyinde hasta grubunda Bacteroidetes oranı düşük saptanırken, Firmicutes oranı daha yüksek saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubu arasında bağırsak florasının çeşitliliği ve zenginliğinin farklı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre; koroner kalp hastalığı insidansı bağırsak mikrobiyotasındaki değişimle ilişkili olabilir (98).

Aterosklerotik plaklarda bakteri varlığını araştıran 1791 hastanın dâhil edildiği bir meta-analiz yayınlanmıştır. Karotis endarterektomi, kateter bazlı aterektomi veya benzer prosedürler uygulanarak alınan aterosklerotik plaklar içinde tek tek veya birlikte var olan 23 oral kommensal bakteri varlığı doğrulanmıştır. *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* ve *Prevotella nigrescens*' in koroner plaklara özgü olduğu açıklanmıştır. Bu bakterilerin oral florada yer alması, inflamasyonla oral bakteriyel mikrobiyota ilişkisini ortaya koymasının yanında aterosklerotik plakla ilişkili oral kommensal bakterilerin sistematik olarak sınıflandırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir (99).

Koroner arter hastalığında bağırsak mikrobiyotasının kardiyo - metabolik parametreler ve bağışıklık üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya DM tanısı olan 16 koroner arter hastası ve

benzer demografik özelliklere sahip DM tanısı olmayan 16 koroner arter hastası alınmıştır. Dışkı örneklerinden elde edilen bakteriyel DNA örnekleri biyoinformatik analiz (QIIME ve PICRUST) yöntemiyle ayrıştırılarak analiz edilmiştir. Filum düzeyinde incelendiğinde; diyabetik grupta Bacteroidetes düzeyi düşükken, Firmicutes ve Proteobacteria düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, kommensal bakteriler (*Faecalibacterium prausnitzii* ve *Bacteroides fragilis* gibi) ve fırsatçı patojenler (*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* ve *Desulfovibrio* gibi) diyabetiklerde anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Ek olarak, aynı grupta zonulin, TMAO ve IL-1B plazma seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekken, IL-10 ve FOXP3 mRNA ekspresyon seviyeleri anlamlı derecede düşük saptanmıştır. Bu sonuçlar koroner arter hastalığında azalmış immun sistem regülasyonunun DM varlığı ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Ayrıca DM varlığının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu ve işlevselliğini etkilediğini göstermektedir (100). Koroner arter hastalığında bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikleri saptamak amacıyla yapılan bir çalışmaya 70 hasta ve 90 sağlıklı kontrol dâhil edilmiştir. Bireylerden alınan dışkı örneklerinden 16S rRNA gen dizilimi yapılarak bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıklar incelenmiştir. *Escherichia - Shigella*, *Enterococcus*, *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Roseburia* ve *Eubacterium rectale*' nin hasta grubunda önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (101).

Kalp kapak kalsifikasyonu veya koroner arter hastalığında intestinal mikrobiyatadaki farklılıkları araştıran bir çalışmada; enterokoklar kalp kapak kalsifikasyonu olan hastalarda anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Ayrıca enterokok düzeyi hem kardiyak troponin I düzeyi hem de KY gibi bazı kardiyovasküler hastalıklarda artış gösteren alanin transaminaz (ALT) düzeyi ile pozitif korelasyon göstermiştir (102).

Bağırsak mikrobiyotasının KKY'deki potansiyel rolü belirsizliğini korumaktadır ve şu ana kadar çeşitli yöntem ve sonuçları içeren küçük çalışmalar bildirilmiştir. KY'de splanknik sirkülasyonda oluşan konjesyon, intestinal bariyerin bozulmasına bağlı bakteriyel translokasyon, bakterilerin aşırı çoğalması, konak savunma mekanizmalarındaki bozukluklar endotoksemiye ve bu da sistemik inflamasyonun alevlenmesine yol açabilir. Diğer bir ifadeyle, KY'de, hipoperfüzyon ve konjesyon intestinal bariyer fonksiyonlarını bozabilir ve bu da bakteriyel translokasyon ile sistemik inflamasyonu artırabilir ve KY alevlenmelerini artırabilir. Dahası, bağırsak lümeninde hipoksinin artışının, hiperkapninin, lokal pH değişikliklerinin mikrobiyotadaki bakteriyel virulansı, ve inflamatuvar süreci artıran bir faktör olduğu bilinmektedir. Bağırsakta faydalı bakteri nüfusu azaldığında, gram negatif bakterilerin

çoğalmasına zemin oluşur. Bu bakteriler öldüğünde, pro-enflamatuar etkileriyle bilinen endotoksin (lipopolisakarit) salgırlar. İntestinal bariyerin bozulmasıyla da salgılanan lipopolisakaritler kan dolaşımına geçerek TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin salınmasını tetikler ve sistemik inflamasyonun alevlenmesine neden olur. (95,103).

Kalp yetersizliği hastalarında inflamasyonun bağırsak bakteri çeşitliliğine etkisini araştıran bir çalışmada, hasta grubunda serum immunglobulin A- antilipopolisakarit düzeyinin yüksek olduğu ve bunun da kolon mukoza biyopsisinde dışkıda bulunmayan artmış bakteri aşırı çoğalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (104).

Sandek ve ark. 2007 yılında KKY’de inflamasyon ile mikrobiyota ilişkisini araştırdıkları çalışmada, KKY’li hastaların bağırsak duvarında bakteri konsantrasyonunun ve mukozal biyofilmde çeşitliliğin arttığını saptamışlardır. Ek olarak, laktuloz- manitol testi ile bağırsak geçirgenliğinin arttığını da göstermişlerdir (54).

Kronik kalp yetersizliği hastalarında patojenik bağırsak florasının ve bağırsak geçirgenliğinin varlığını ve bunların hastalık şiddeti, venöz konjesyon ve enflamasyonla ilişkisini araştıran bir çalışmada, özellikle NYHA sınıf 3-4 olan KKY hastalarında Shigella, Salmonella, Yersinia enterolytica ve Candida türleri ve Campylobacter dâhil patojen bakterilerde belirgin artış saptanmıştır. Ayrıca selüloz şeker testi ile KKY hastalarında artmış bağırsak geçirgenliği gösterilmiştir (105).

Mamic ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada benzer demografik özellik ve komorbiditelere sahip KY tanısıyla taburcu edilen hastalarda KY’si olmayanlara kıyasla Clostridium difficile enfeksiyon oranını daha yüksek saptamışlardır (106).

Kalp yetersizliğinde intestinal mikrobiyotada spesifik değişiklikler olup olmadığını araştıran bir çalışmada, iskemik dilate kardiyomiyopati tanısı olan 20 hastanın fekal örnekleri bakteriyel 16S rRNA geninin yüksek verimli sekanslanması uygulanarak incelenmiştir. Hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılaşma gösteren bakteriyel çeşitlilikte azalma saptanmıştır. Hastalarda, aile düzeyinde Coriobacteriaceae, Erysipelotrichaceae ve Ruminococcaceae düzeylerinde, cins düzeyinde ise Blautia, Collinsella, sınıflandırılmamış Erysipelotrichaceae ve sınıflandırılmamış Ruminococaceae seviyelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (107).

Kalp yetersizliğinde inflamasyon ve konjesyonun azalan bağırsak mikrobiyal çeşitlilikle ilişkisini araştıran ve 67 KKY hastasının dâhil edildiği bir çalışmada, artan alfa çeşitliliği, azalan IL-6, TNF-a ve CRP düzeyleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Beta çeşitliliği IL-6, TNF-a ve CRP düzeyleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. Artan Faecalibacterium prausnitzii, azalmış CRP, IL-6 ve TNF-a düzeyi ve Roseburia faecis, azalan CRP, IL-6, TNF- a, IL-10 ve ET-1

düzeyi ve *Cardiobacterium* genera, artmış CRP, IL-6, TNF- a düzeyleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca *Desulfovibrio* cinsindeki taxonları içeren 50'den fazla taxon CD-146 düzeyi ile ilişkili bulunmuştur. Bu sonuçlar KY'de inflamasyonun mikrobiyal çeşitlilik ile ilişkili olduğunu göstermektedir (108).

Mayerhofer CCK. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; KY tanılı stabil hastalarda, bağırsak mikrobiyotasını hedefleyen ilaçların sol ventrikül fonksiyonları, fonksiyonel kapasite, bağırsak sızıntısı ve inflamasyon belirteçleri üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu <% 40 olan 150 KY'li hasta dâhil etmişlerdir. Hastaları rifaximin tedavisi alan, *Saccharomyces boulardii* içeren probiyotik tedavisi alan ve kontrol grubu şeklinde 3 gruba ayırarak 3 ay boyunca gözlemlemişlerdir. Primer sonlanım noktası sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonundaki iyileşmedir. Çalışma henüz takip aşamasında olup 2019 yılı içerisinde sonuçlarının açıklanması beklenmektedir (109). Bu çalışmanın, bağırsak mikrobiyotası, inflamasyon, metabolik bozukluklar ve kalp fonksiyonu arasındaki etkileşimin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonuçları KY hastalarında yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine öncülük edeceği düşünülmektedir.

On iki KKY ve 12 sağlıklı gönüllü ile tasarlanan, KKY'nin bağırsak mikrobiyotası ile ilişkisini araştıran bir çalışmada, bireylerden alınan dışkı örneklerinden 16S rRNA gen dizilimi yapılarak bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıklar incelenmiştir. Ayrıca 60 yaşından küçük 12 KKY hastasının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu, 60 yaş ve üstü 10 KKY hasta ile karşılaştırılmıştır. Yapılan UniFrac analiz sonucunda *Eubacterium rectale* ve *Dorea longicatena*, KKY hastalarının bağırsak mikrobiyotalarında sağlıklı gönüllülere göre daha az miktarda bulunmuştur. Daha genç KKY hastaları ile karşılaştırıldığında, yaşlı KKY hastalarında *Bacteroidetes* oranlarında azalma ve daha fazla miktarda *Proteobakteri* görülmüştür. Ayrıca *Faecalibacterium* cinsi bakterilerin izlenmemiş olup yaşlı KKY hastalarının bağırsak mikrobiyotalarında *Lactobacillus* daha fazla izlenmiştir. Bu sonuçlara göre; KKY bağırsak disbiyozisi ile ilişkilidir ve bu disbiyozis yaşla değişkenlik göstermektedir (110).

Biz de çalışmamıza benzer demografik özelliklere sahip, akdeniz tipi diyet ile beslenen kronik hastalık öyküsü olmayan, son iki ay içerisinde antibiyotik kullanmamış 19 KY hastası ile 21 sağlıklı gönüllü dâhil ettik. Çalışmaya dâhil edilen hasta ve kontrol grubunun büyük bir çoğunluğu koroner arter hastasıydı. Hasta grubunu farklı kılan tek özellik, hastalarda KY tanısının olmasıydı. Çalışmamızda KY hastalarının bağırsak mikrobiyotasını normal popülasyonla karşılaştırmadık. KY tanısı olanları, koroner arter hastalığı olanlarla karşılaştırdık

ki KY'nin mikrobiyota zenginlik ve çeşitliliğine olan etkisini KAH'dan bağımsız olarak gözlemlemeyi amaçladık.

Alınan serum örneklerinden, Gal-3, IL-1B, IL-6, CRP, Endotoksin, LBP, TNF- α ve pBNP düzeylerini araştırdık. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda IL-1B, TNF- α ve CRP düzeylerini anlamlı olarak daha yüksek saptadık. Ancak, iki grup arasında mikrobiyota çeşitliliği ve zenginliği açısından fark olmadığını gözlemledik.

Elde ettiğimiz sonuçlar, alfa çeşitliliği etkilememektedir fakat hasta grubunun bağırsak mikrobiyotasında farklılıklar olduğuna yönelik bulgular içermektedir. Bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu, dışkı örneklerinden yüksek verimli kültürden bağımsız 16S rRNA gen dizilimi kullanarak analiz ettik. Bu teknik, gastrointestinal hastalıklar, obezite, diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar da dâhil olmak üzere birçok hastalıkta mikrobiyal disbiyozisi ortaya koymuştur. Çalışmamız, bağırsak disbiyozisin KY ile ilişkili olduğuna yönelik bulgular içermektedir.

Çalışmamızda, tür düzeyinde *Lactobacillus letivazi*'yi hasta grubunda daha yüksek saptadık. Ancak, bu yüksekliğin cins ve filum seviyesinde mikrobiyal çeşitliliği ve zenginliği etkilememektedir. *Lactobacillus letivazi*, *Trifolium thalii* bitkisinden izole edilen, firmicutes şubesine ait bir türdür. İsviçre Federal Gıda Araştırma Enstitüsü tarafından tanımlanmış ve JCL3994 adıyla gen bankasında saklanmaktadır. Bugüne kadar yapılan birkaç çalışmada hayvanların gastrointestinal yolağında bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca kronik obstrüktif akciğer hastalıkları alevlenmeleri ile başvuran hastalardaki hava yolu mikrobiyotasının incelenmesi esnasında saptanmıştır (111). Ancak mevcut literatür verilerinde *Lactobacillus letivazi*'nin fonksiyonları hakkında net bir bilgi yoktur.

Cins düzeyinde ise Enterokok hasta grubunda daha yüksek saptanmıştır. Ancak, bu yüksekliğin tür ve filum seviyesinde mikrobiyal çeşitliliği ve zenginliği etkilememektedir. Enterokoklar, gram pozitif koklardır. Birkaç istisna dışında aerobik veya fakültatif anaerob ve katalaz negatif bakterilerdir. İnsan normal gastrointestinal flora üyesi olan enterokokların ağız boşluğu, safra yolları ve genitoüriner sistemde kolonize oldukları bilinmektedir. İmmünespresif hastalarda, hastanede uzun süre yatan hastalarda ve antibiyotik kullanımı sonrası enterokok infeksiyonlarında artış görülmektedir (112).

Yukarıda anlatılan örnek çalışmalarda enterokok düzeyi, koroner arter hastalığında azalırken, KY'de artan ALT düzeyi ile korelasyon göstermiştir. Bizim de elde ettiğimiz sonuçlar literatür verilerine benzerdir. Ancak, bu mikroorganizmaların hem koroner arter hastalığı hem de KY'si

olan grupta yüksek iken sadece koroner arter hastalığı olan grupta düşük olması neden mi yoksa sonuç mu olduğu net değildir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları; öncelikle az sayıda hastayı içeren tek merkezli bir çalışmaydı. İkincil olarak, mikrobiyaya üzerine etkisi olabilecek diğer faktörlerin etkisini mümkün olduğunca azaltmak için çalışmanın dışlama kriterleri geniş tutulmuştur. Bunun sonucunda hasta grubunda kan inflamatuvar marker seviyelerinden de görülebileceği üzere inflamasyon düzeyi görece düşüktür. Benzer şekilde, dekompanze hastaların ve yatan hastaların dışlanması da daha stabil hasta gruplarının oluşmasına neden olmuştur. Bu durum gruplar arasındaki farkın azalmasına yol açmış olabilir.

Üçüncü olarak, ardışık hasta alımı, erkek hastaların gruplarda belirgin çokluğu ile sonuçlanmıştır. Bu durum, erkek popülasyonda bu hastalıkların daha sık görülmesiyle açıklanabilir. Örneğin, kadınlarda KAH gruplarının düşük olması ve KKY nedenleri arasında kapak hastalığı gibi diğer nedenlerin belirgin yüksekliği bu sonuca yol açmış olabilir. Son olarak, grupların diyet alışkanlıkları objektif olarak değerlendirilmemiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada iskemik KY'li hastalara göre bağırsak mikrobiyota çeşitliliğinde fark gözlenmese de, iki grup arasında mikrobiyal farklılıklar tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların, KY patofizyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlayacağını düşünüyoruz. Ancak, elde edilen veriler prospektif ya da nedensellik araştıran ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ahmad T, Butler J, Borlaug B. The Diagnosis and Management of Heart Failure. In : Hurst's The Heart. Ed. Valentin Fuster. McGraw Hill Education. 2017; pp : 1690-1725
2. Damman K, Voors AA, Navis G, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. The cardiorenal syndrome in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis.* 2011 Sep-Oct; 54(2):144-53.
3. H.Kronmal R, Bluemke DA, Olson J, Shea S, Liu K, et al. Differences in the Incidence of Congestive Heart Failure by Ethnicity. *The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Arch Intern Med.* 2008 Oct 27; 168(19): 2138–45
4. Curtis LH, Whellan DJ, Hammill BG, Hernandez AF, Anstrom KJ, Shea AM. Incidence and prevalence of heart failure in elderly persons, 1994-2003. *Arch Intern Med.* 2008 Feb 25;168(4):418-24
5. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Nov 3; 54(19):1747-62.
6. Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, Chioncel O, Greene SJ, Vaduganathan M, et al. The Global Health and Economic Burden of Hospitalizations for Heart Failure: Lessons Learned From Hospitalized Heart Failure Registries. *J Am Coll Cardiol. Elsevier;* 2014 Apr 1; 63(12):1123–33.
7. Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology. Karger Publishers;* 2012 Jun 12; 122(1):23–35.
8. Cialdella P, Pedicino D, Gustapane M, Santangeli P, Narducci ML, Pelargonio G, et al. Inflammatory markers in heart failure. *J Cardiovasc Med.* 2013 May; 14(5):342–50.
9. Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* 2008 Jan; 24(1):4–10.
10. Wong JMW, Esfahani A, Singh N, Villa CR, Mirrahimi A, Jenkins DJA, et al. Gut microbiota, diet, and heart disease. *J AOAC Int.* 2012 Jan-Feb; 95(1):24–30.
11. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut.* 2016 Feb; 65(2):330–39.
12. Krack, A, Sharma, R, Figulla, H. R. & Anker, S. D. The importance of the gastrointestinal system in the pathogenesis of heart failure. *Eur. Heart J.* 2005 Nov; 26(22): 2368–74.

13. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong M-L, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J*. 2013 Dec 2;13(6): 514–22.
14. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*. Public Library of Science; 2010 Feb 5; 5(2):9085.
15. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 2013 Apr 25; 368(17):1575–84.
16. Tang WHW, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2014 Oct; 124(10):4204–11.
17. Alverdy J, Zaborina O, Wu L. The impact of stress and nutrition on bacterial-host interactions at the intestinal epithelial surface. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005 Mar; 8(2):205–9.
18. Rodriguez AJ, Mousa A, Ebeling PR, Scott D, de Courten B. Effects of vitamin D supplementation on inflammatory markers in heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2018 Jan 18; 8(1):1169.
19. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, 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. *Eur Heart J*. 2016 Jul 14; 37(27):2129-200.
20. Barry A, Borlaug, Walter J. Paulus. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J*. 2011 Mar; 32(6): 670–79.
21. 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.

22. Bayliss J, Norell MS, Canepa-Anson R, Reid C, Poole-Wilson P, Sutton G. Clinical importance of the renin-angiotensin system in chronic heart failure: double blind comparison of captopril and prazosin. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985 Jun 22; 290(6485):1861-65
23. 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.
24. Hasenfuss G, Mann DL. Pathophysiology of heart failure. In: *heart disease. A textbook of cardiovascular Medicine*. Eds: RB Bonow, DL Mann, DP Zipes, P Libby, E Braunwald. 2018;442-461
25. Harper AR, Patel HC, Lyon AR. Heart failure with preserved ejection fraction. *Clin Med (Lond)*. 2018 Apr 1; 18(2):24–29.
26. Patel HC, Hayward C, di Mario C, Cowie MR, Lyon AR, Rosen SD. Heart failure with preserved ejection fraction: the impact of stricter definitions. *Eur J Heart Fail*. 2014 Jul; 16(7): 767–71.
27. Redfield M, Jacobsen S, Burnett J, Mahoney D, Bailey K, Rodeheffer R. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community. Appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 2003 Jan 8; 289(2):194– 202.
28. Pierpont GL, DeMaster EG, Reynolds S, Pederson J, Cohn JN. Ventricular myocardial catecholamines in primates. *J Lab Clin Med* 1985 Aug; 106(2):205–10.
29. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* 2005 May 31;111(21): 2837–49.
30. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003 Nov 14; 93(10): 896–906
31. Van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2005 Jul 1; 67(1):21-9.
32. 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 Jan 21; 129(3):28-292.

33. Mentz RJ, Stevens SR, DeVore AD, Lala A, Vader JM, AbouEzzeddine OF, et al. Decongestion strategies and renin-angiotensin aldosterone system activation in acute heart failure. *JACC Heart Fail.* 2015 Feb; 3(2): 97–107.
34. Konstam MA, Neaton JD, Dickstein K, Drexler H, Komajda M, Martinez FA, et al. Effects of high-dose versus low-dose losartan on clinical outcomes in patients with heart failure (HEAAL study): a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2009 Nov 28; 374(9704):1840–8
35. Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Itoh H, Saito Y, Nakao K. Two cardiac natriuretic peptide genes (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) are organized in tandem in the mouse and human genomes. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Aug; 28(8):1811–5.
36. Cleland J, Taylor J, Freemantle N, Goode K, Rigby A, Tendera M. Relationship between plasma concentrations of N-terminal pro brain natriuretic peptide and the characteristics and outcome of patients with a clinical diagnosis of diastolic heart failure: a report from the PEP-CHF study. *Eur J Heart Fail* 2012 May; 14(5): 487-94.
37. Inoue K, Naruse K, Yamagami S, Mitani H, Suzuki N, Takei Y. Four functionally distinct C-type natriuretic peptides found in fish reveal evolutionary history of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 19; 100(17):10079–84.
38. Patel JB, Valencik ML, Pritchett AM, Burnett JC, Jr, McDonald JA, Redfield MM. Cardiac-specific attenuation of natriuretic peptide A receptor activity accentuates adverse cardiac remodelling and mortality in response to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Aug; 289(2):777-84
39. Abukar Y, May CN, Ramchandra R. Role of endothelin-1 in mediating changes in cardiac sympathetic nerve activity in heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016 Jan 1; 310(1):94-9
40. Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Muller F, Andreassen AK, et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999 Feb 1; 83(3): 376–382.
41. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Leonardo A, Zornoff M. Cardiac Remodelling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016 Jan; 106(1): 62–69.

42. Véronique L. Roger. Epidemiology of Heart Failure. *Circ Res.* 2013 Aug 30; 113(6): 646–59.
43. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2015 Jan 27; 131(4):29-322.
44. Maggioni AP, Dahlstrom U, Filippatos G, Chioncel O, Crespo Leiro M, Drozdz 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
45. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011 Apr 7; 472(7341): 57–63.
46. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013 May; 19(5): 576–85.
47. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread Coronary Inflammation in Unstable Angina. *N Eng J Med,* 347: 5-12, (2002 Jul 4).
48. Shirazi LF, Bissett J, Romeo F, Mehta JL. Role of Inflammation in Heart Failure. *Curr Atheroscler Rep.* 2017 Jun; 19(6):27.
49. Oikonomou E, Tousoulis D, Siasos G, Zaromitidou M, Papavassiliou AG, Stefanadis C. The Role of Inflammation in Heart Failure: New Therapeutic Approaches. *Hellenic J.Cardiol,* 2011 Jan-Feb; 52(1): 30-40.
50. Yoshida N, Yamashita T, Hirata K. Gut Microbiome and Cardiovascular Diseases. *Diseases.* 2018 Sep; 6(3): 56
51. Tang W.H, Kitai T, Hazen S. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res.* 2017 Mar 31; 120(7): 1183–96.
52. Xu Z, Knight R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. *Br J Nutr* 2015 Jan; 113(1):1–5.
53. Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-FarhaM. The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes. *Lipids Health Dis,* 2016 Dec; 15(1): 108.

54. Sandek A, Bauditz J, Swidsinski A, Buhner S, Weber-Eibel J, von Haehling S, et al. Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Oct 16; 50(16):1561–69.
55. Arutyunov GP, Kostyukevich OI, Serov RA, Rylova NV, Bylova NA. Collagen accumulation and dysfunctional mucosal barrier of the small intestine in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2008 Apr 10; 125(2):240–245.
56. Sandek A, Bjarnason I, Volk HD, Crane R, Meddings JB, Niebauer J, et al. Studies on bacterial endotoxin and intestinal absorption function in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2012 May 17; 157(1):80–85.
57. Charalambous BM, Stephens RC, Feavers IM, Montgomery HE. Role of bacterial endotoxin in chronic heart failure: the gut of the matter. *Shock*. 2007 Jul; 28(1):15-23
58. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008 Jun; 57(6):1470–81.
59. Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*. 1999 May 29; 353(9167):1838-42.
60. Torre-Amione G, Anker SD, Bourge RC, Colucci WS, Greenberg BH, Hildebrandt P, et al. Results of a non-specific immunomodulation therapy in chronic heart failure (ACCLAIM trial): a placebo-controlled randomised trial. *Lancet*. 2008 Jan 19; 371(9608):228-36.
61. Paul MR, Brendan ME, Tom T, Jean G. MacFadyen BA, William HC, Christie B, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017 Sep 21; 377(12):1119-31
62. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017 Jun 1; 474(11): 1823–36.
63. Miele L, Giorgio V, Alberelli MA, De Candia E, Gasbarrini A, Grieco A. Impact of gut microbiota on obesity, diabetes, and cardiovascular disease risk. *Curr Cardiol Rep*, 2015 Dec; 17(12):120.
64. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Aug 21; 104(34): 13780-85.

65. Herrema H, IJzerman RG, Nieuwdorp M. Emerging role of intestinal microbiota and microbial metabolites in metabolic control. *Diabetologia*. 2017 Apr; 60(4):613-17.
66. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*, 2015 Sep; 33(9):496-503.
67. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015 Feb 2; 26(0):26050
68. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol*. 2005 Oct; 51(4): 270–74.
69. Knol J, Boehm G, Lidestri M, Negretti F, Jelinek J, Agosti M, et al. Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed preterm infants. *Acta Paediatr*. 2005 Oct; 94(449):31-33
70. Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010 Nov; 26(6): 564–71
71. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes / Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*, 2009 Jun 9; 9(1):123.
72. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 Mar 15; 108(1):4586-91.
73. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JBL, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia* 2010 Apr; 53(4):606-13.
74. Zhang M, Chekan JR, Dodd D, Hong PY, Radlinski L, Revindran V, et al. Xylan utilization in human gut commensal bacteria is orchestrated by unique modular organization of polysaccharide degrading enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014 Sep 2; 111(35): 3708-17.
75. Chambers ES, Preston T, Frost G, Morrison DJ. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr Nutr Rep*. 2018 Dec; 7(4):198–206

76. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016 May 3; 7(3):189–200
77. Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM, et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS One*, 2015 May 18; 10(5): e0126931.
78. Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, 2012 Aug; 4(8):1095-119.
79. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010 Aug 17; 107(33): 14691-6.
80. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 2009 Nov 11; 1(6):6-14.
81. Azad AK, Sarker M, T, Yin J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res Int*. 2018 May 8; 2018: 9478630
82. Jones ML, Martoni CJ, Prakash S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*, 2012 Nov; 66(11):1234-41.
83. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev*. 2017 Sep; 279(1): 90–105
84. Mika A, Van Treuren W, González A, Herrera JJ, Knight R, Fleshner M. Exercise is more effective at altering gut microbial composition and producing stable changes in lean mass in juvenile versus adult male F344 rats. *PLoS One*, 2015 May 27; 10(5): 0125889
85. Yamashita T, Hayashi T, Yoshida N, Hirata KI. Gut Microbial Dysbiosis in Heart Failure- Is It a Future Therapeutic Target or Not? *Circ J*. 2018 May 25; 82(6):1507-09
86. Organ CL, Otsuka H, Bhushan S, Wang Z, Bradley J, Trivedi R, et al. Choline diet and its gut microbe-derived metabolite, trimethylamine n-oxide, exacerbate pressure overload-induced heart failure. *Circ Heart Fail*, 2016 Jan; 9(1):e002314.

87. Wang Z, Tang WH, Buffa JA, Fu X, Britt EB, Koeth RA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J*. 2014 Apr; 35(14): 904-10.
88. Sandek A, Rauchhaus M, Anker SD, von Haehling S. The emerging role of the gut in chronic heart failure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 Sep; 11(5):632-9.
89. Krüger S, Kunz D, Graf J, Stickel T, Merx MW, Koch KC, et al. Endotoxin hypersensitivity in chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2007 Feb 7; 115(2):159-63
90. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev*. 2017 Apr; 3(1): 7–11.
91. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016 Jul 7; 535(7610):85–93
92. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7; 21(29): 8787–803.
93. Buford TW. Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease. *Microbiome*. 2017 Jul 14; 5(1): 80
94. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-Time PCR Quantitation of Clostridia in Feces of Autistic Children. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Nov; 70(11):6459-65.
95. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014 Mar 27; 157(1):121-41
96. Clemente C, Manasson J, Scher JU. The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ*. 2018 Jan 8; 360:j5145.
97. Robert A. Koeth, Zeneng Wang, Bruce S. Levison, Jennifer A. Buffa, Elin Org, Brendan T. Sheehy, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 May; 19(5): 576–85.
98. Cui L, Zhao T, Hu H, Zhang W, Hua X. Association Study of Gut Flora in Coronary Heart Disease through High-Throughput Sequencing. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 3796359.
99. Chhibber-Goel J, Singhal V, Bhowmik D, Vivek R, Parakh N, Bhargava B, et al. Linkages between oral commensal bacteria and atherosclerotic plaques in coronary artery disease patients. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2016 Dec 19; 2(1): 2-7.
100. Sanchez-Alcoholado L, Castellano-Castillo D, Jordán-Martínez L, Moreno-Indias I, Cardila-Cruz P, Elena D, et al. Role of Gut Microbiota on Cardio-Metabolic Parameters

- and Immunity in Coronary Artery Disease Patients with and without Type-2 Diabetes Mellitus. *Front Microbiol.* 2017 Oct 5;8: 1936.
101. Zhu Q, Gao R, Zhang Y, Pan D, Zhu Y, Zhang X, et al. Dysbiosis signatures of gut microbiota in coronary artery disease. *Physiol Genomics.* 2018 Oct 1; 50(10):893-903.
 102. Liu Z, Li J, Liu H, Tang Y, Zhan Q, Lai W, et al. The intestinal microbiota associated with cardiac valve calcification differs from that of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2018 Dec 4; 284:121-128.
 103. Mahesh S. Desai, Anna M. Seekatz, Nicole M. Koropatkin, Nobuhiko Kamada, Christina A. Hickey, Mathis Wolter, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell.* 2016 Nov 17; 167(5): 1339–53.e21
 104. Sandek A, Swidsinski A, Schroedl W, Watson A, Valentova M, Herrmann R, et al. Intestinal blood flow in patients with chronic heart failure: a link with bacterial growth, gastrointestinal symptoms, and cachexia. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Sep 16;64(11):1092-102.
 105. Pasini E, Aquilani R, Testa C, Baiardi P, Angioletti S, Boschi F, et al. Pathogenic Gut Flora in Patients With Chronic Heart Failure. *JACC Heart Fail.* 2016; 4(3):220–7.
 106. Mamic P, Heidenreich PA, Hedlin H, Tennakoon L, Staudenmayer KL. Hospitalized Patients with Heart Failure and Common Bacterial Infections: A Nationwide Analysis of Concomitant *Clostridium Difficile* Infection Rates and In-Hospital Mortality. *J Card Fail.* 2016 Nov; 22(11):891-900.
 107. Luedde M, Winkler T, Heinsen FA, Rühlemann MC, Spehlmann ME, Bajrovic A, et al. Heart failure is associated with depletion of core intestinal microbiota. *ESC Heart Fail.* 2017 Aug; 4(3):282-90.
 108. Ryan T Demmer, Pauline N Trinh, Amelia M Zuver, Duygu Onat, Nasrin Akter, Eugene A Royzman, et al. Relationship Between Gut Microbiota, Inflammation and Congestion Among Advanced Heart Failure Patients. *Circulation.* 2017 Nov 14;136:A18591
 109. Mayerhofer CCK, Awoyemi AO, Moscovitch SD, Lappegård KT, Hov JR, Aukrust, et al. Design of the GutHeart-targeting gut microbiota to treat heart failure-trial: a Phase II, randomized clinical trial. *ESC Heart Fail.* 2018 Oct; 5(5):977-84

110. Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, et al. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS ONE*. 2017 Mar 22; 12(3): e0174099
111. Huang YJ, Kim E, Cox MJ, Brodie EL, Brown R, Wiener-Kronish JP, et al. A Persistent and Diverse Airway Microbiota Present during Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. *OMICS*. 2010 Feb; 14(1): 9–59.
112. Acar JF, Buu-Hoi AY. Resistance patterns of important gram-positive pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 1988 Apr; 21 (100):41–47.