

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

TEZİN ADI

**İSKEMİK VE NON-İSKEMİK KALP YETMEZLİĞİNDE
PERİFERİK KAN PLATELET METİLASYON PROFİLİNİN
BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ


DR. VİLDAN ÖZÇAKIR ŞENDUR

**DANIŞMAN
PROF.DR. HALİL TANRIVERDİ**

DENİZLİ – 2018

Prof. Dr. Halil TANRIVERDİ danışmanlığında Dr. Vildan ÖZÇAKIR ŞENDUR tarafından yapılan “İskemik ve Non-İskemik Kalp Yetmezliğinde Periferik Kan Platelet Metilasyon Profilinin Belirlenmesi ” başlıklı tez çalışma jürimiz tarafından Kardiyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN:

 Prof. Dr. Halil TANRIVERDİ

ÜYE:

Doç. Dr. İsmail Dajın Kalkan

ÜYE:

Doç. Dr. Hasan GÜNGÖR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

//

Prof. Dr. ~~Osman Çiftçi~~

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Tez sürecindeki ilgi, destek, hoşgörü, yardım ve katkıları nedeniyle tez danışmanım Prof. Dr. Halil TANRIVERDİ'ye, Doç. Dr. İ. Doğu KILIÇ'a ve Doç. Dr. Aylin KÖSELER'e;

Asistanlık eğitimim süresince olan destek ve katkıları, sağladıkları çalışma ortamı ve koşullar ile mutlu ve verimli bir asistanlık süresi geçirmemi sağlayan, bana her açıdan sabırla katlanan hocalarım Prof. Dr. Dursun DURSUNOĞLU'na, Prof. Dr. H. Asuman KAFTAN'a, Doç. Dr. Y. Tolga YAYLALI 'ya, Doç. Dr. Gökay NAR'a ve Dr. Öğretim Üyesi Samet YILMAZ'a,

Asistanlık sürecinde birlikte yol aldığım tüm asistan arkadaşlarıma,

Her aşamada sevgisini, desteğini ve anlayışını hissettiğim canım eşim İbrahim ŞENDUR'a ve yaşamımın her döneminde olduğu gibi tez dönemimde de desteklerini esirgemeyen aileme ve bana güç ve mutluluk veren canım kızım Ilgın'ıma sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET.....	XII
1.GİRİŞ-AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KALP YETMEZLİĞİ	3
2.1.1. Tanımı.....	3
2.1.2. Kalp Yetmezliği Sınıflandırması	4
<i>New York Kalp Cemiyeti işlevsel sınıflaması</i>	4
<i>Amerikan Kardiyoloji Koleji / Amerikan Kalp Cemiyeti evreleme sistemi</i>	5
2.1.3. Etiyoloji	5
2.1.4. Epidemiyoloji	6
2.1.5. Patofizyoloji.....	7
2.1.6. Belirti ve bulgular	8
2.1.7. Temel başlangıç incelemeleri	8
<i>Rutin laboratuvar testleri</i>	8
<i>Natriüretik peptitler</i>	9
<i>Elektrokardiyogram (EKG)</i>	9
<i>Ekokardiyografi</i>	9
<i>Transözofajiyal ekokardiyografi</i>	10
<i>Göğüs radyografisi</i>	10
<i>Kardiyak manyetik rezonans</i>	10
<i>Koroner anjiyografi</i>	11

2.2. MİTOKONDİRİ	11
2.2.1. Mitokondriyal DNA' nın yapı ve işlevi.....	12
2.2.2. Mitokondriyal DNA genleri	13
2.3. EPİGENETİK VE METİLASYON	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ	36
7. KAYNAKLAR	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

EF: Ejeksiyon Fraksiyonu

KY: Kalp Yetmezliği

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

mtDNA: mitokondriyal DNA

ATP: Adenozin Trifosfat

CO: Sitokrom C Oksidaz

ND: NADH Dehidrogenaz

RNA: Ribo Nükleik Asit

tRNA: taşıyıcı RNA

DEF-KY: Düşük Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği

ODEF-KY: Orta Düzey Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği

KEF-KY: Korunmuş Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği

SV: Sol Ventrikül

MI: Miyokard İnfarktüsü

KAH: Koroner Arter Hastalığı

AF: Atriyal Fibrilasyon

LBBB: Sol Dal Bloğu

BNP: B tipi Natriüretik Peptit

NT-proBNP: N-Terminal pro B tipi Natriüretik Peptit

EKG: Elektrokardiyogram

AV: Atriyoventiküler

KMR: Kardiyak Manyetik Rezonans

ADP: Adenozin Difosfat

Pi: Fosfat

bç: baz çifti

H: ağır

L: hafif

rRNA: ribozomal RNA

D-loop: Displacement loop
mRNA: Messenger RNA
C: Sitozin
CH3: Metil grubu
5m-C: 5-metil sitozin
DNMT: DNA Metil Transferazlar
SAM: S-Adenozil-L Metiyonin
G: Guanin
CpG: Sitozin-fosfat-Guanin
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
GZ-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
MSP: Metilasyon-Spesifik PZR
ml: mililitre
ACD-B: Acid Citrate Dextrose
d-NTP: deoksinükleotid
EDTA: EtilenDiamin Tetraasetik Asit
MgCl₂: Magnezyum klorid
mM: milimol
HCL: Hidroklorik asit
STE: Sodyum Klorür-Tris. HCl-EDTA
nm: nanometre
µg: mikrogram
O.Y.: Optik Yoğunluk
TBE: Tris-Borat-EDTA
MD: Mikro Dalga
UV: UltraViyole
µl: mikrolitre
cm: santimetre

mm: milimetre

ng: nanogram

pmol: pikomol

ark.: arkadaşları

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

KVH: Kardiyovasküler Hastalıklar

MELAS: Myoklonus Epilepsi Laktik Asidoz inme

AKY: Akut Kalp Yetmezliği

ŞEKİL NO	ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA NO
Şekil 1	Ökaryotik hücrelerde mitokondrinin yapısı	11
Şekil 2	İnsan mtDNA yapısı	12
Şekil 3	Mitochondrial DNA	14
Şekil 4	Elektroforezde %2'lik agaroz jel'de 90 volt'ta 30 dakika yürütülen DNA örneklerinin görünümü.	24
Şekil 5	MtDNA ATP-6: Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.	26
Şekil 6	MtDNA ATP-8: Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.	26
Şekil 7	MT-TL1: Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.	27
Şekil 8	MT-ND5: Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.	27
Şekil 9	MT-CO1: Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.	27
Şekil 10	MT-CO2: Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.	28
Şekil 11	MT-CO3: Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.	28

TABLO NO	TABLULAR DİZİNİ	SAYFA NO
Tablo 1	Semptomların ciddiyetini ve fiziksel aktiviteyi temel alan New York Kalp Cemiyeti işlevsel sınıflaması	4
Tablo 2	Kullanılan primer çiftleri	21
Tablo 3	PCR işleminde kullanılan genel protokol.	24
Tablo 4	MtDNA sitokrom c oksidaz (MT-CO1, MT-CO2 ve MT-CO3); tRNA lösin 1 (MT-TL1); ATP sentaz (MT-ATP6 and MT-ATP8); ve NADH dehidrogenaz (MT-ND5) gen bölgelerinde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyondaki hacim ve konsantrasyonları	25

ÖZET

İSKEMİK VE NON-İSKEMİK KALP YETMEZLİĞİNDE PERİFERİK KAN PLATELET METİLASYON PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

DR. VİLDAN ÖZÇAKIR ŞENDUR

Kalp yetmezliği, sık başvuru gerektiren kronik bir hastalıktır ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle son yıllarda genetik araştırmalarına ağırlık verilmiştir. Bilindiği gibi trombositler, kardiyovasküler hastalıkların etyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondri ise trombositlerin enerji kaynağı ve mtDNA da trombositlerin sahip olduğu tek genomik materyaldir. Kardiyovasküler hastalıkların etyolojisinde, epigenetik faktörlerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. MtDNA metilasyonu ise bu alanda daha yeni ve araştırılma aşamasında olan bir konudur. Bir çalışmada hipertansiyon, ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkları olan bireylerde, kontrol grubuna göre, mtDNA'nın bazı gen bölgelerinde anlamlı metilasyon artışı izlenmiştir. Biz ise çalışmamızda, trombositlerdeki mtDNA'nın artmış metilasyonunun, iskemik veya non-iskemik kalp yetmezliği etyolojisinde tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmayı amaçladık. Trombositlerdeki mtDNA metilasyon analizi, mtDNA'nın ATP sentezi ile ilişkisinden faydalanılarak yapılmıştır. Bu bağlamda analizi yapılan genler; sitokrom c oksidaz (CO), ATP sentaz, NADH dehidrogenaz (ND) ve taşıyıcı RNA (tRNA) lösin 1'dir. Çalışma, Mart 2017 – Mart 2018 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Kardiyoloji kliniğine başvuran, ekokardiyografide simpson metodu ile yapılan ölçümlerde ejeksiyon fraksiyonu (EF) % 40 ve altında olan 55 kalp yetmezliği hastası ve 30 sağlıklı birey ile gerçekleştirilmiştir. 55 kalp yetmezliği hastası, yapılan koroner anjiyografi sonrasında iskemik ve non-iskemik kalp yetmezliği olarak 2 gruba ayrılmıştır. 30 hasta iskemik kalp yetmezliği grubunda, 25 hasta non-iskemik kalp yetmezliği grubunda yer almıştır. Çalışmamızda, Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizinde, hem iskemik ve non-iskemik hasta gruplarında hem de kontrol grubunda, CO-1,2,3, tRNA lösin 1, ATP 6-8 ve ND5 gen bölgelerinde metilasyon saptanmamıştır. Çalışmamızın sonucuna göre kalp

yetmezliği ile trombosit mtDNA metilasyonu arasında bir ilişki yoktur. Trombositlerdeki mtDNA metilasyon profilinin, iskemik ve non-iskemik kalp yetmezliği etyolojisinde tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağının anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kalp yetmezliği, trombosit, mitokondriyal DNA

SUMMARY

THE DETERMINATION OF PERIPHERAL BLOOD PLATELET METHYLATION PROFILE AT ISCHEMIC AND NON-ISCHEMIC HEART FAILURE

DR. VİLDAN ÖZÇAKIR ŞENDUR

Heart failure is a chronic disease requiring frequent referral and genetic researches have been emphasized in recent years due to its high mortality. As is known, platelets play an important role in the etiology of cardiovascular diseases. Mitochondria is the energy source of platelets and mtDNA is the only genomic material that platelets have. In the etiology of cardiovascular diseases, numerous studies have been conducted regarding the epigenetic factors. MtDNA methylation is a more recent subject that is under investigation. In one study, significant increase in methylation is observed in some gene regions of mtDNA in the individuals with cardiovascular diseases such as hypertension, atherosclerosis, when compared to the control group. In the present study, it is aimed to investigate whether increased methylation of mtDNA in the platelets can be used as a diagnostic biomarker in the etiology of ischemic or non-ischemic heart failure. mtDNA methylation analysis in the platelets is conducted by benefiting from the correlation of mtDNA with the ATP synthesis. Thus, the genes analysed are cytochrome c oxydase (CO), ATP synthase, NADH dehydrogenase (ND) and carrier RNA (tRNA) leucine 1. The study is conducted with 55 patients with heart failure having 40% or less ejection fraction (EF) in the measurements performed by the simpson method in ecocardiography who had applied to the Department of Cardiology of Pamukkale University between March 2017 and March 2018, and with 30 healthy individuals. 55 patients with heart failure are divided in 2 groups after the coronary angiography, as ischemic and non-ischemic heart failure groups. 30 patients are present in the ischemic heart failure group and 25 patients are in the non- ischemic heart failure group. In the present study, in the methylation-specific PCR DNA Sequence Analysis, no methylation is

observed in both ischemic and non-ischemic patient groups and in the control group in the CO-1,2,3, tRNA leucine 1, ATP 6-8 and ND5 gene regions. According to the results of the study, there is no correlation between heart failure and platelet mtDNA methylation. Further studies are needed to understand whether the mtDNA methylation profile in platelets can be used as a diagnostic biomarker in the etiology of ischemic and non-ischemic heart failure.

Keywords: Heart failure, platelet, mitochondrial DNA

1.GİRİŞ-AMAC

Kalp yetmezliği (KY), kalpteki yapısal veya işlevsel bozukluk sonucu, kalp debisinde azalma veya kalp basınçlarında yükselme oluşturan, hastalarda nefes darlığı, bacaklarda şişlik, halsizlik gibi tipik belirtilerin ve bazen de beraberinde artmış juguler ven basıncı, akciğerde krepitasyon, periferik ödem gibi bulguların görülebildiği klinik bir sendromdur. Kalp yetmezliği tanımı, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (EF) %40'ın altında olan düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği, %40-49 arasında olan orta düzey EF'lu kalp yetmezliği, %50 ve üzerinde olan korunmuş ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği olarak 3 gruba ayrılır (1).

Kalp yetmezliği, tanı ve tedavisinde gelişmeler olmasına karşın, akut koroner sendrom sonrası iyileşen hasta sayısının artması ve dolayısıyla yaşlı popülasyonun da artması sebebiyle gün geçtikçe artan önemli bir kardiyovasküler mortalite ve morbidite sebebidir (2). Kalp yetmezliğinin genel nüfusta prevalansı %0.3-2 arasında değişmekle birlikte, >65 yaş bu rakam %3-5'lere, >75 yaş ise %25'lere varmaktadır (3-7). On yılda kalp yetmezliğinden ölüm oranı % 40, 15 yılda % 56' dır. Ciddi kalp yetmezliği olan kişilerdeki ölüm oranı ise bir yılda % 40- 70 gibi oldukça yüksektir (8). Yaşı 65'den fazla olan hastaların üçte biri 3 ay içinde kalp yetmezliği nedeniyle hastaneye tekrar gelmekte ve neredeyse yarısı 6 ay içinde yeniden hastaneye giriş yapmaktadır (9-11).

Kalp yetmezliği, sık başvuru gerektiren kronik ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Bu nedenle son yıllarda genetik araştırmalarına ağırlık verilmiştir. Bilindiği gibi trombositler, kardiyovasküler hastalıkların etyolojisinde, ateroskleroz patogeneğinde ve akut trombotik olayların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca mitokondri de kalbin fonksiyonlarını devam ettirebilmesinde kritik bir role sahiptir. Trombositler kendi nükleusundan yoksun olup genomik materyal olarak sadece mitokondriyal genoma sahiptirler. Bundan dolayı, trombositlerdeki mitokondriyal genlerin epigenetik regülasyonu araştırmaların ilgi odağı olmuştur.

DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) metilasyonu gen ifadesini değiştirerek hücre fonksiyonlarını değiştiren epigenetik bir olaydır. Epigenetik, genetik kodun fonksiyonel modifikasyonudur. Epigenetik değişiklikler, gen ifadesini değiştirerek,

hastalıkların gelişiminde etkin rol oynayabilir ve yeni tedavi seçenekleri için hedef belirlemede yol gösterebilir (12).

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, nükleer DNA metilasyonu ile kardiyovasküler hastalıklar arasında net bir ilişki bulunamamıştır (13). MtDNA (mitokondriyal DNA) ile yapılan çalışmalarda ise mtDNA kopya sayısındaki azalmanın kalp yetmezliği için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve kalp yetmezliği olan hastalarda kardiyovasküler mortaliteyi arttırdığı gösterilmiştir (12). Diğer bir çalışmada ise otofajiden kaçan mtDNA'nın miyokardit ve dilate kardiyomiopati ile ilişkili olduğu, ayrıca mtDNA varyantlarının inflamasyon, anjiogenez ve sinyalizasyon genlerinin metilasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (14,15). Yapılan bazı araştırmalarda ise, trombosit mtDNA'sında epigenetik regülasyonların kardiyovasküler hastalıklarda rolü olduğu ve mtDNA metilasyonunun kardiyovasküler hastalıklar için tanısal bir biyomarker olabileceği belirtilmiştir. Ancak mtDNA metilasyon seviyesi nükleer DNA'ninkinden çok daha az olduğu için mtDNA metilasyonu ile ilgili birçok husus hala belirsizdir (16,17).

Biz çalışmamızda, trombositlerdeki mtDNA'nın artmış metilasyonunun, iskemik veya non-iskemik kalp yetmezliği etyolojisinde tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmayı amaçladık. Trombositlerdeki mtDNA metilasyon analizi, mtDNA'nın ATP (adenozin trifosfat) sentezi ile ilişkisinden faydalanılarak yapılmıştır. Bu bağlamda analizi yapılan genler; sitokrom c oksidaz (CO), ATP sentaz, NADH dehidrogenaz (ND) ve tRNA (taşıyıcı Ribo Nükleik Asit) lösin 1'dir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KALP YETMEZLİĞİ

2.1.1 Tanımı

Kalp yetmezliği (KY), kalpteki yapısal veya işlevsel bozukluk sonucu, kalp debisinde azalma veya kalp basınçlarında yükselme oluşturan, hastalarda nefes darlığı, bacaklarda şişlik, halsizlik gibi tipik belirtilerin ve bazen de beraberinde artmış juguler ven basıncı, akciğerde krepitasyon, periferik ödem gibi bulguların görülebildiği klinik bir sendromdur. Kalp yetmezliği tanımı, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (EF) %40'ın altında olan düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği (DEF-KY), %40-49 arasında olan orta düzey EF'lu kalp yetmezliği (ODEF-KY) %50 ve üzerinde olan korunmuş ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği (KEF-KY) olarak 3 gruba ayrılır (1).

Kalp yetmezliği için tek bir tanısal test yoktur, tanı büyük oranda klinikdir; dikkatli anamnez alımı ve fiziksel muayeneye dayanır. Kalp yetmezliği, kendini sıklıkla dispne ve yorgunluk olarak gösterir ki bu durum efor kapasitesini azaltır. Sıvı retansiyonu da sık görülen klinik tablolardan biridir, bu durum da pulmoner ve/veya periferik ödeme yol açabilir. Kalp yetmezliğine sebep olan kardiyak nedenin gösterilmesi önemlidir. En sık sebebi iskemik kalp yetmezliğidir. Miyokardit, kalp kapak hastalıkları, perikard patolojileri, kalp ritm ve ileti anormallikleri de KY' ne neden olabilmektedir. Sebep olan kardiyak patolojinin belirlenmesi doğru tedavi açısından da büyük önem taşır (18).

Kalp yetmezliği olan hastaların sınıflandırılmasında; hastaların komorbid durumlarının, prognozlarının ve tedavi yanıtlarının ayrımı için ve çoğu klinik çalışmada hasta seçimi EF'ye bağlı olduğu için, kalp yetmezliğinde EF önemli bir yer almaktadır (19). EF değerleri, görüntüleme tekniğine, analiz metoduna ve operatöre bağlıdır. Diğer taraftan, daha hassas yöntemlerle sistolik işlev ölçümü, korunmuş ve normal EF değeri olan hastalarda anormallikler gösterebilir, bu yüzden korunmuş ya da azalmış sistolik işlev terimi yerine korunmuş ya da azalmış EF terimi tercih edilmektedir. Çoğu hastada, EF'den bağımsız olarak sistolik ve diastolik disfonksiyon beraber görülür (20,21).

2.1.2.Kalp Yetmezliği Sınıflandırması

New York Kalp Cemiyeti işlevsel sınıflaması (Tablo 1)

Tablo 1. Semptomların ciddiyetini ve fiziksel aktiviteyi temel alan New York Kalp Cemiyeti işlevsel sınıflaması

SINIF I	Fiziksel aktivite kısıtlanması yoktur. Olağan fiziksel etkinlik, beklenenin üzerinde nefes darlığı, halsizlik ya da çarpıntıya yol açmaz.
SINIF II	Hafif fiziksel etkinlik kısıtlanması mevcuttur. Dinlenme sırasında rahattır, ancak olağan fiziksel aktivite beklenenin üzerinde nefes darlığı, halsizlik ya da çarpıntıya yol açar.
SINIF III	Belirgin fiziksel etkinlik kısıtlanması vardır. Dinlenme sırasında rahattır, ancak olağan düzeyin altında fiziksel aktivite nefes darlığı, halsizlik ya da çarpıntıya yol açar.
SINIF IV	Rahatsızlık duymadan herhangi bir fiziksel etkinlik sürdürülemez. Dinlenme sırasında belirtiler olabilir. Herhangi bir fiziksel aktivite yapılması durumunda rahatsızlık artar.

Akut ve kronik kalp yetersizliği tanı ve tedavisine yönelik 2012 ESC kılavuzu

Amerikan Kardiyoloji Koleji / Amerikan Kalp Cemiyeti evreleme sistemi

Evre A: Yapısal kalp hastalığı olmayan, kalp yetersizliği gelişmesi açısından yüksek riskli hastalardır. Bu hastalarda kalp yetmezliğinin işaret ve semptomları yoktur. Örneğin; sistemik hipertansiyon, koroner arter hastalığı, diabetes mellitus.

Evre B: Yapısal kalp hastalığı olan ancak henüz kalp yetmezliği semptomları gelişmemiş hastalardır. Bu hastalarda kalp yetmezliği gelişme olasılığı yüksektir. Kalp yetmezliğinin işaret ve semptomları yoktur. Örneğin; sol ventrikül (SV) hipertrofisi, büyük dilate ventriküller, kapak hastalığı, geçirilmiş miyokard infarktüsü (MI).

Evre C: Altta yatan yapısal kalp hastalığı ile ilişkili şimdi veya geçmişte kalp yetmezliği semptomları olan hastalardır.

Evre D: Optimal tedaviye rağmen kalp yetmezliğinin belirgin semptomları olan hastalardır. Bu hastalar özel ileri tedavilere ihtiyaç duyarlar. Örneğin; Hastaneden güvenle taburcu edilemeyen, devamlı hastane bakımı gerektiren, hastanede kalp nakli bekleyen, semptomların rahatlaması için evde devamlı intravenöz ilaç tedavisi alan hastalar veya mekanik dolaşım desteği alan hastalardır (22).

2.1.3.Etiyoloji

Kalp yetmezliği; iskemik, infektif, inflamatuvar, immün, endokrin, metabolik, genetik ve neoplastik nedenlere bağlı ya da kalbin yetersiz gelişiminden veya gebelik kaynaklı da olabilir. Kronik KY, miyokardiyal disfonksiyon, aritmi, kapak hastalıkları veya perikard hastalıklarına bağlı olabilir. Akut sol KY'nin en yaygın sebebi akut MI'dür. Hipertansiyon ve diyabet olasılıkla pek çok olguda katkıda bulunan etmenler olsa da, koroner arter hastalığı (KAH) sistolik KY olgularının yaklaşık üçte ikisinin nedenidir. Sistolik KY'nin geçirilmiş viral enfeksiyonlar (teşhis edilebilmiş veya edilememiş), alkolün kötüye kullanımı, kemoterapi (örn. doksorubisin veya trastuzumab) ve 'idiyopatik' dilate kardiyomyopati gibi başka pek çok sebebi vardır (18).

2.1.4.Epidemiyoloji

Nüfusun yaşlanması, koroner olay gelişen hastalarda sağkalımı uzatmada elde edilen başarılar ve yüksek risk grubundaki kişilerde ikincil koruma ile koroner olayları ertelemeye kaydedilen başarılar nedeniyle KY prevalansı yükselmektedir (4). Gelişmiş ülkelerde erişkin toplumun yaklaşık %1-2' sinde KY' ne rastlanmakta, KY prevalansı 70 yaş ve üzerindeki bireylerde \geq %10'e kadar yükselmektedir. KY' nin pek çok nedeni vardır ve nedenler dünyanın farklı bölgelerinde değişiklikler gösterir. KY hastalarının en az yarısında EF düşüktür (23). On yılda kalp yetmezliğinden ölüm oranı % 40, 15 yılda % 56' dır. Ciddi kalp yetmezliği olan kişilerde ölüm oranı ise bir yılda % 40- 70 gibi oldukça yüksek bir orandadır (8). Yaşı 65'den fazla olan hastaların üçte biri üç ay içinde kalp yetmezliği nedeniyle hastaneye tekrar gelmekte ve hemen hemen yarısı 6 ay içinde yeniden hastaneye giriş yapmaktadır (9-11).

Erkeklerde koroner arter hastalığı daha erken yaşlarda görülmesi sebebiyle genç yaş gruplarında KY erkeklerde daha sıktır ancak, yaşlılarda her iki cinsiyetteki prevalans eşitlenmektedir. Korunmuş ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği, düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliğine göre daha farklı epidemiyolojik görünüş sergilemektedir. KEF-KY'li hastalar, DEF-KY hastalarına göre daha yaşlı, sıklıkla kadın cinsiyette ve daha kilolu hastalardır. Bu grup hastada koroner kalp hastalığına daha az, hipertansiyon ve atriyal fibrilasyona ise daha sık rastlanmaktadır. KEF-KY hastalarının prognozu DEF-KY hastalarına göre daha iyidir (24).

Tedavide modern çağın başladığı 1990'lı yıllardan evvel, hastaların %60-70'i tanı konduktan sonra 5 yıl içinde ölmekte ve pek çok ülkede, kötüleşen belirtilerle hastane başvuruları, epidemiler halinde, sık ve tekrarlayıcı nitelikte seyretmekteydi. Etkili tedaviler bu iki sonucu da iyileştirmiş, son yıllarda hastaneye yatışlarda %30-50 oranında, mortalitede ise daha küçük ancak anlamlı oranda göreceli bir azalma sağlanmıştır (25-27).

2.1.5.Patofizyoloji

Kalp yetmezliği patogenezinin, basit ve tek bir model ile açıklanamayacağı, başlangıçtaki tetikleyici olayı takiben nörohormonal aktivasyon ve ventrikülün yeniden şekillenmesinin, kalp yetmezliğinin progresyonunu belirleyen başlıca olaylar olduğu bilinmektedir. KY, kalbin pompalama kapasitesinde azalmaya veya bu pompa fonksiyonunu korumak için diyastolik basıncını artırmak zorunda kalmasına sebep olan tetikleyici bir olay ile başlar. Başlıca tetikleyici üç faktör vardır. Bunlar intrinsek miyokard hasarı, sol ventrikül üzerinde basınç ve volüm yüklenmesi, son olarak da perikardiyal restriktif hastalıklar, yüksek debili hastalıklar gibi ekstrinsek sebeplerdir (28).

SV sistolik işlev bozukluğu olan hastalarda, miyokart hasarı (örneğin miyokart enfarktüsü) sonrası geriye kalan miyositlerde ve ekstraselüler matrikste maladaptif değişiklikler gözlenir. Ventrikülde genişleme ile patolojik yeniden şekillenme (remodeling) ve kasılmanın azalması (düşük EF) bu değişikliklerin sonuçlarıdır (29,30).

Tedavi edilmemiş sistolik işlev bozukluğunun karakteristik özelliği sol ventrikül genişlemesinde artış ve EF'de düşüştür. Bu olumsuz ilerlemeden iki farklı mekanizmanın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Birincisi, ilave miyosit ölümüne yol açacak yeni olayların gelişmesidir (örneğin tekrarlayan miyokart enfarktüsü). Diğeri ise, sistolik işlevlerdeki azalmanın tetiklediği, özellikle nörohumoral aktivasyon gibi, sistemik yanıtlardır. KY'de aktive olan iki anahtar nörohumoral sistem, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi ve sempatik sinir sistemidir. Bu sistemik yanıtlar, yeni miyokart hasarına ek olarak, damarlara, böbreklere, kaslara, kemik iliğine, akciğerlere ve karaciğere de zarar verirler ve miyokardın elektriksel stabilitesinin bozulmasının da dahil olduğu KY ile ilişkili pek çok klinik durumdan sorumlu olan patofizyolojik kısır döngüyü oluştururlar. Bu iki anahtar sürecin engellenmesi, KY'nin etkili tedavilerinden çoğunun temelini oluşturur (29-30). Klinik olarak sözü edilen değişiklikler, işlevsel kapasiteyi ve yaşam kalitesini kötüleştirir, hastane başvurusu gerektiren dekompanseasyon ataklarına yol açar ve genellikle pompa yetersizliği veya ventriküler aritmiler nedeniyle erken ölümlere sebep olur. KY hastalarının sınırlı kardiyak rezervi, aynı zamanda atriyumların

kasılmasına, sol ventrikülün eş zamanlı (senkron) olarak kasılmasına ve sağ ile sol ventrikül arasındaki ilişkiye bağlıdır. Bunlardan herhangi birini etkileyen olaylar, örneğin atriyal fibrilasyon (AF) gelişimi, sol dal bloğu (LBBB) gibi ileti bozuklukları veya anemi gibi kalbe ek hemodinamik yük bindiren durumlar akut dekompanseasyon ataklarına neden olabilmektedir (31).

2.1.6. Belirti ve bulgular

KY klinik bulguları genellikle sodyum ve su tutulumuna bağlıdır, bu nedenle özgül değildir ve KY ile diğer sorunlar arasında ayırıcı tanı yapmak kolay olmayabilir. Örneğin periferik ödemin kardiyak sebepler dışında birçok nedeni vardır. KY için ortopne, paroksizmal nokturnal dispne gibi daha özgül olan belirtiler KY'nin erken evrelerinde daha az sıklıkta görülür. Sodyum ve su tutulumundan kaynaklanan bulgular diüretik tedavi ile hızla gerileyeceğinden bu tedaviyi almakta olan hastalarda KY tanısını koymak daha zor olabilir. Juguler ven basıncı artışı ve kalp tepe vurusunun sola kayması gibi daha özgül bulguları tespit etmek de daha zordur (32-36). Ayrıca obez bireylerde, yaşlılarda ve kronik akciğer hastalığı olanlarda, belirti ve bulguların saptanmasına yönelik ileri tetkikler gerekebilir (37-39).

2.1.7. Temel başlangıç incelemeleri

Rutin laboratuvar testleri

Glukoz, sodyum, potasyum, kreatinin/hesaplanmış glomerul filtrasyon hızı, karaciğer fonksiyon testleri, tiroid fonksiyon testleri, albümin gibi biyokimyasal parametreler ve tam kan sayımı ayırıcı tanı ve tedavi şekillenmesi açısından önem taşır. Tedavi öncesi kontrolü kadar, tedavi sonrası izlemde de biyokimyasal tetkikler önemlidir. Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi blokerleri, diüretikler, steroid olmayan antiinflamatuar ilaç kullanımında, ishal, kusma gibi sıvı ve elektrolit kaybına yol açan hastalıklar olduğunda biyokimyasal izlem yine önem taşır (31).

Natriüretik peptitler

KY belirti ve bulgularının özgül olmaması nedeniyle, KY şüphesi ile ekokardiyografiye yönlendirilen pek çok hastada önemli bir kardiyak bozukluk saptanamamaktadır. Ekokardiyografinin tanıda yeterli olmadığı veya ekokardiyografiye ulaşılabilirliğin kısıtlı olduğu durumlarda, tanıda bir alternatif yaklaşım, herhangi bir kalp boşluğundaki yük arttığında, yüksek miktarlarda salgılanan bir hormon ailesi olan natriüretik peptitlerin kan konsantrasyonunu ölçmektir. Fakat natriüretik peptitlerin, pulmoner emboli, böbrek yetersizliği gibi durumlarda da artabileceği akılda tutulmalıdır. Tedavi almamış hastalarda normal natriüretik peptit seviyeleri KY'ni hemen hemen dışlar ve ekokardiyografi yapılmasına gerek kalmayabilir (40-43). Ayrıca natriüretik peptit seviyeleri yaşla birlikte artar, obez kişilerde de düşük olabilir (39). Çok sayıda çalışma en sık kullanılan iki natriüretik peptit tipi (B tipi natriüretik peptit (BNP) ve N-terminal pro B tipi natriüretik peptit (NT-proBNP)) için, KY'yi dışlayan eşik değerleri araştırmıştır. Akut başlangıçlı veya durumu kötüleşen hastalarda, en uygun dışlama kestirim değeri, NT-proBNP için 300 pg/mL ve BNP için 100 pg/mL'dir. Akut olmayan durumlarda uygun dışlayıcı kestirim değeri NT-proBNP için 125 pg/mL ve BNP için 35 pg/mL'dir. Akut olmayan hastalarda BNP ve NT-proBNP'nin KY tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü daha düşüktür (44-51).

Elektrokardiyogram (EKG)

Sol ventrikül hipertrofisi, AV blok, geçirilmiş ön yüz MI, LBBB, AF sıklıkla kalp yetmezliğinde gözlenen anormal EKG bulgularıdır. EKG, KY hastalarında prognoz hakkında bilgi verebilir(52,53).

Ekokardiyografi

Kalbin anatomisi, sol ve sağ ventrikül fonksiyonları, kapak fonksiyonları, pulmoner arter basıncı, perikard hastalıkları gibi birçok kardiyak patoloji hakkında hızlı bilgiler verir. Bu bilgiler, uygun tedaviye karar vermede kritik öneme sahiptir, örneğin ciddi kapak hastalıklarında cerrahi tedavi gibi. Sol ventrikül EF'u, hacimlere, ön yüke, art yüke, kalp hızına ve kapak işlevlerine bağlı olduğu için atım hacmi ile aynı anlama gelmez. Atım hacmi, KEF-KY hastalarında ve SV konsantrik

hipertrofisinde azalabilirken, DEF-KY hastalarında SV genişlemesine bağlı olarak korunabilir. Belirgin mitral yetersizliği olan hastalarda EF korunabilirken, atım hacmi azalabilir. Bu yüzden EF klinik olarak yorumlanmalıdır. EF'yi ölçmede önerilen ekokardiyografik yöntem apikal biplan diskler yöntemi yani modifiye Simpson yöntemidir (54-63).

Transözofajiyal ekokardiyografi

Obezite, kronik akciğer hastalığı, ventilatördeki hastalar gibi transtorasik ultrason penceresinin yetersiz olduğu durumlar dışında rutin tanısal değerlendirmede gerekli değildir. Özellikle mitral kapak hastalıkları ve protez kapaklar, şüpheli endokardit ve bazı doğumsal kalp hastalığı olan hastalarda önemlidir. Ayrıca, AF hastalarında sol atriyal apendikte trombüs varlığının kontrolü için de kullanılmaktadır (31).

Göğüs radyografisi

KY tanısında kullanımı sınırlıdır. Hastanın belirti ve bulgularını açıklayacak alternatif pulmoner nedenlerin veya KY ne bağlı oluşan pulmoner ödemin ortaya çıkarılması gibi durumlarda faydalıdır. Kardiyomegaliyi saptamada da faydası vardır ancak, göğüs radyografisinde kardiyomegali olmadan da belirgin SV sistolik işlev bozukluğunun olabileceği akılda tutulmalıdır (31).

Kardiyak manyetik rezonans

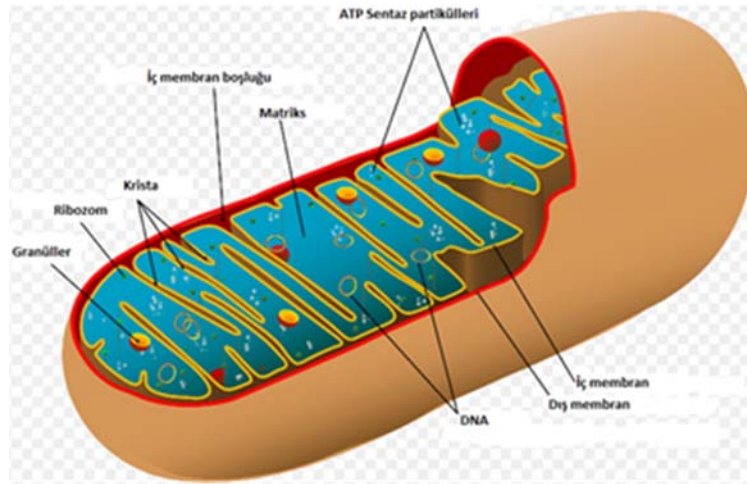
İskemi ve canlılık değerlendirmesi de dahil olmak üzere, ekokardiyografi ile elde edilen anatomik ve işlevsel bilgilerin çoğunu sağlayabilen invaziv olmayan bir tekniktir (64-66). Hacim, kütle ve duvar hareketlerinin değerlendirilmesinde altın standarttır. Ekokardiyografik çalışmalarda tanı konamayan hastalarda en iyi alternatif görüntüleme seçeneğidir. KMR, inflamatuvar ve infiltratif durumların tanı ve prognozunun değerlendirilmesinde önemlidir (66).

Koroner anjiyografi

Kardiyak arrest, angina pectoris gibi durumlarda, hasta koroner revaskülarizasyon için uygunsa koroner anjiyografi yapılmalıdır. Geri döndürülebilir miyokart iskemisinin kanıtı olan hastalarda, EF düşüşünde, anjiyografi düşünülmelidir. Akut KY, kardiyojenik şok, akut akciğer ödemi olan bazı hastalarda, özellikle bu durum akut koroner sendromla ilişkili ise, koroner anjiyografi acil olarak gereklidir (67).

2.2. MİTOKONDİRİ

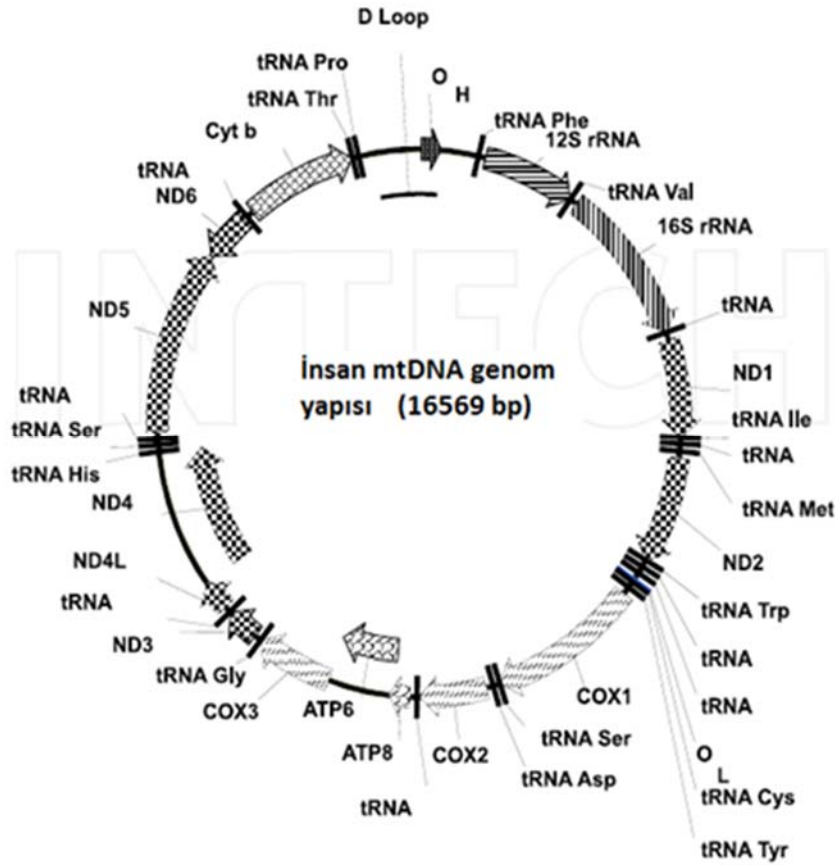
Ökaryotik hücrelerde bulunan, bir dış membran ve girintili çıkıntılı yapısı bulunan iç membrana sahip bir organeldir (Şekil 1). Oksidatif fosforilasyon merkezi olduğu 1948 de Eugene Kennedy ve Albert Lehninger tarafından bulunmuştur. Organizmada oksidatif yıkım ürünlerinden alınan elektronların moleküler oksijene aktarılması sırasında açığa çıkan enerji ile ADP ve Pi den ATP sentezlenmesi olayı oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır (68).



Şekil 1. Ökaryotik hücrelerde mitokondrinin yapısı

2.2.1. Mitokondriyal DNA'nın yapı ve işlevi

İnsan mitokondri DNA'sı 16569 baz çifti (bç) büyüklüğünde, kapalı, dairesel, çift zincirli bir moleküldür (Şekil 2). İnsan mitokondri DNA'sının tüm baz dizisi ve genom organizasyonu 1981 yılında Anderson ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır (69). MtDNA zincirlerinden guanin içeriği fazla olan zincire ağır zincir (H zincir), sitozin içeriği fazla olana ise hafif zincir (L zincir) denir. Ağır zincirden 12S ve 16S ribozomal RNA (rRNA), 13 polipeptit ve 14 taşıyıcı RNA (tRNA) sentezlenir. Hafif zincirden ise bir polipeptit ve 8 tRNA sentezlenir (70). Her iki zincirin birbirinden ayrı replikasyon orijini vardır. Ağır zincirin replikasyon orijini D-loop (Displacement loop) isimli kontrol bölgede yer alır (71). İnsan mtDNA'sında genler çok sıkı paketlenmiştir (72). Genler arası bölge yoktur. Genler içinde intronlara rastlanmaz. Genetik kodda farklılıklar görülür. Şöyle ki; UGA dur kodonu değildir ve triptofan kodlamaktadır. AGA arjinin kodonu ise mtDNA'da dur kodonu olarak çalışmaktadır (73).



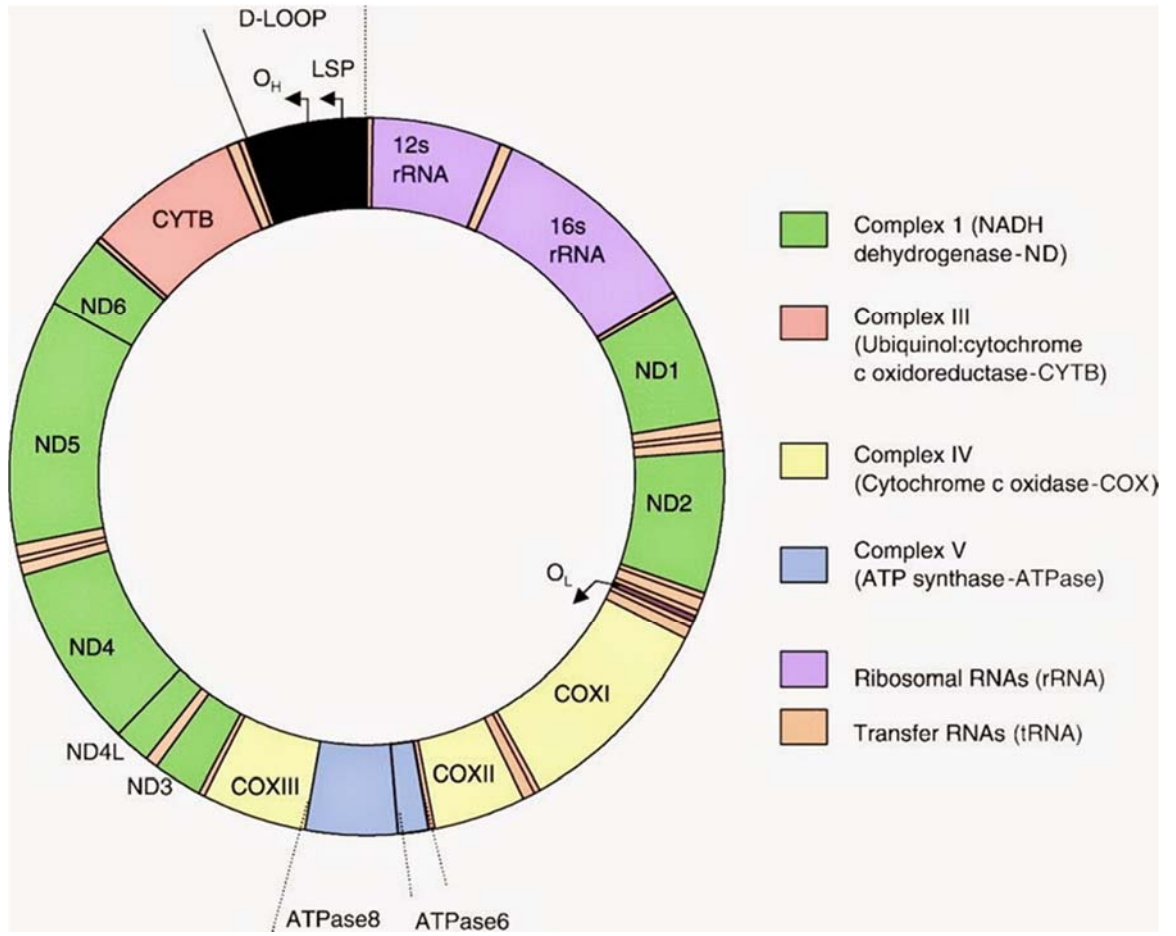
Şekil 2. İnsan mtDNA yapısı

Mitokondri DNA'sının çekirdek DNA'sından bağımsız replikasyon ve transkripsiyon sistemi vardır. Ancak mtDNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli bütün enzimler çekirdek DNA tarafından kodlanır. D-loop olarak adlandırılan mekanizmaya göre replike olmaktadır. Ağır zincirin replikasyon orijinininden sentez başlar ve 5'→3' saat yönünde ilerlerken H zincir açılır. Yeni sentezlenen zincir L zincirin replikasyon orijinine geldiği anda ters yönde yeni L zincir sentezlenmeye başlar. Böylece iki zincirin replikasyonu birbirine ters yönde ilerler ve 5'→3' yönünde devamlı sentez olduğu için Okazaki fragmentleri içermez (74).

2.2.2. Mitokondriyal DNA genleri

Mitokondriyal DNA da toplam 37 gen bulunur. Bunların 13' ü m-RNA; kompleks I (NADH Dehidrogenaz, ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), kompleks III (ubiquinol, sitokrom c oksidoredüktaz), kompleks IV (sitokrom c oksidaz- CO 1-3), kompleks V (ATP sentaz; ATPase 6,8), 2' si ribozomal RNA (12S ve 16S) ve 22' si de taşıyıcı RNA (Şekil 3).

Biz kompleks IV (sitokrom c oksidaz- CO 1-3), kompleks V (ATP sentaz; ATPase 6,8), NADH Dehidrogenaz (ND5), taşıyıcı RNA lösün 1 genleri üzerinde çalışma yaptık.



Şekil 3. Mitochondrial DNA

2.3. EPIGENETİK VE METİLYASYON

Epigenetik, biyolojide, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan, gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalıdır. Yaşam stili, beslenme alışkanlığı, spor gibi çevresel faktörlerin genlerin aktivitesini düşürmesi veya yükseltmesi ile ortaya çıkan rahatsızlıkları inceler. Başka bir ifade ile DNA dizisinde hiçbir değişiklik gerçekleşmeden genlerin fazla ya da yetersiz çalışmasından kaynaklanan durumlardır (75). Epigenetik, DNA metilasyon modifikasyonu ve kromatin yeniden düzenlemesini kapsayan, DNA sekansında bir değişiklik olmaksızın meydana gelen gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmıştır (76).

Ökaryotik hücreler gen ifadesi kontrolünü sağlayabilmek için çekirdekte yüksek derecede kontrol edilen, dinamik ve karmaşık bir yapı olan kromatini kullanırlar. Kromatin yapısı, yapısal ve kimyasal birtakım değişimlere uğrayarak gen ifadelerini etkilemektedir. DNA'nın çok sıkı paketlenmiş formu olan kromatin yapının DNA replikasyonu sırasında açılmasıyla, kalıp zincirde var olan yapısal ve kimyasal modifikasyonlar, diğer bir deyişle "epigenetik işaretler" yeni sentezlenen zincirlere aktarılır ve bu şekilde her bir replikasyon sırasında hücreden hücreye korunur (77). Kromatin yapı üzerinde meydana gelen epigenetik modifikasyonların genlerin ifadelerini etkilemesi, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi temel epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (78).

Son dönemde üzerinde çok çalışılan ve hakkında en çok bilgi sahibi olunan epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısının düzenlenmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprinting ve kromozom stabilitesinin sağlanması gibi birçok hücrenel süreçte rol oynayan önemli bir epigenetik mekanizmadır. Kanseri, inflamatuvar hastalıklar, bazı sendromlar ile ilişkili bulunmuştur (78). DNA metilasyonu kovalent bir modifikasyondur ve sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH₃) eklenmesi ve 5-metil sitozin (5m-C) yapısının oluşmasıyla karakterize edilir (79). Bu kimyasal tepkime, DNA metil transferazlar (DNMT) tarafından katalizlenmektedir. Bu enzimler, metil grubu donörü olan S-adenozil-L-metiyonin (SAM)'den metil grubu olarak sitozinin 5. karbonuna transfer ederler

(80). DNA metilasyonu, genomdaki sitozin (C) ve guanin (G) çiftlerinin art arda sıralanmasıyla oluşan CpG dizilerinin yoğunlaştığı bölgelerde gerçekleşmektedir (81,82).

Bugüne kadar DNA metilasyonu ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu, promotor bölgedeki metilasyona odaklanmıştır. Aslında, promotor bölge metilasyonu ile gen sessizleşmesi arasındaki ilişki 1970'lerde tanımlanmıştır. Promotor bölgedeki CpG adacıklarının metillenmesi ve bunun gen ifadesini baskıladığının keşfi, DNA metilasyonunun işlevi hakkında genel algının şekillenmesini sağlamıştır. Şimdilerde ise, DNA metilasyonu ve gen sessizleşmesi arasındaki ilişkinin belirsiz olduğu gündemdedir. DNA metilasyonu, gelişen genom boyu metilasyon haritalamaları sayesinde; transkripsiyon başlama bölgelerinde, ekzon ve intron bölgelerinde, düzenleyici bölgelerde ve tekrar dizilerinde de analiz edilebilmektedir (83).

X kromozomu üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, gen içinde gerçekleşen metilasyon ile aktif transkripsiyon arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur (84). Gen içindeki metilasyonun, transkripsiyonu engellemediği hatta transkripsiyonun uzamasını tetiklediği belirtilmiştir. Promotor bölgedeki metilasyon, gen ifadesi ile negatif korelasyona sahipken, gen içindeki metilasyonunun gen ifadesi ile pozitif korelasyona sahip olmasının açıkça bir paradoks olduğu da vurgulanmıştır. Yani DNA metilasyonunun gen ifadesi üzerine etkilerinin hem baskılama hem de ifadeyi artırma yönünde olabileceği belirtilmiştir (83).

Bugüne kadar geliştirilen DNA metilasyonu analiz yöntemleri, DNA dizisindeki sitozinlerle, 5-metil sitozinlerin ayırt edilmesi esasına dayanmaktadır (85). Analiz yöntemleri iki genel başlık altında toplanabilir. Bunlar, global metilasyon analizleri ve gene özgül metilasyon analizleridir. Gene özgül metilasyon analizleri, genom boyu ve aday gen yaklaşımları olarak iki kategoride incelenebilmektedir (86).

Aday gen yaklaşımları, daha özgül olarak tek bir gen bölgesinin metilasyon durumunu, basit moleküler teknikler ile incelenmesini mümkün kılan yöntemleri içermektedir. Aday gen yaklaşımlarında, bisülfid-bazlı yöntemler, yaygın olarak

kullanılmaktadır. DNA'ya bisülfıt modifikasyonu ve ilgili gen bölgesine özgül polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamalarının ardından jel elektroforezi, GZ-PZR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu), Sanger sekanslama ve pyrosekanslama gibi yöntemlerle devam edilir (86). DNA'nın bisülfıt modifikasyonundan sonra, sadece metillenmiş CpG dizilerine özgül olarak tasarlanan metil-spesifik primerler kullanılarak DNA amplifiye edilir ve oluşan fragmentler jel elektroforezinde yürütülür. Bu şekilde metile olmuş ve olmamış bölgelerin ayırt edilebildiği yönteme Metilasyon-Spesifik PZR (MSP) denir (87).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Çalışma, Mart 2017 – Mart 2018 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Kardiyoloji kliniğine başvuran, ekokardiyografide modifiye Simpson metodu ile yapılan ölçümlerde ejeksiyon fraksiyonu (EF) % 40 ve altında olan, çalışmaya katılma ölçütlerini karşılayan, çalışma ile ilgili bilgilendirildikten sonra yazılı ve sözlü onam veren 55 kalp yetmezliği hastası ve 30 sağlıklı birey ile gerçekleştirilmiştir. 55 kalp yetmezliği hastası, yapılan koroner anjiyografi sonrasında iskemik ve non-iskemik kalp yetmezliği olarak 2 gruba ayrılmıştır. 30 hasta iskemik kalp yetmezliği grubunda, 25 hasta non-iskemik kalp yetmezliği grubunda yer almıştır. Sağlıklı karşılaştırma grubu, çalışma için gerekli sağlıklı birey özelliklerinin hastanede duyurulması ardından yapılan başvurular ile oluşturulmuştur.

Hasta ve sağlıklı kontrol vakaları çalışma hakkında ayrıntılı olarak bilgilendirilmiş, gönüllü olanlardan sözel ve yazılı onam alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Araştırma projesi Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayına sunulmuş, 27.09.2016 tarih ve 2016/17 sayılı karar yazısıyla etik kurul onayı alınmıştır. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'ndan platelet mitokondriyal DNA metilasyon analizi için ödenek alınmıştır (Proje no: 2017TIPF003).

Hasta grubunun çalışmaya alınma ölçütleri; Çalışmaya katılmayı kabul etmiş, iskemik veya non-iskemik kalp yetmezliği tanısı almış, 18-80 yaş arası olgular çalışmaya dahil edilmiştir.

Sağlıklı kontrol grubu için çalışmaya alınma ölçütleri; Çalışmaya katılmayı kabul etmiş, 18-80 yaş arası, kardiyak rahatsızlığı bulunmayan olgular çalışmaya dahil edilmiştir.

Hasta grubunun çalışmadan dışlanma ölçütleri; Kronik böbrek yetersizliği, kronik karaciğer hastalığı, bilinen inflamatuvar hastalığı olanlar, ötiroid olmayan tiroid hastalığı olanlar dahil major metabolik ya da endokrin hastalığı olanlar çalışma dışında tutulmuştur.

Sağlıklı kontrol grubu için çalışmadan dışlanma ölçütleri; Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen, 18 yaş altı ve 80 yaş üstü olan, kronik böbrek yetersizliği, kronik karaciğer hastalığı, bilinen inflamatuvar hastalığı, ötiroid olmayan tiroid hastalığı olanlar dahil major metabolik ya da endokrin hastalığı olanlar çalışma dışında tutulmuştur.

Çalışmada yer alan gönüllü bireylerden ortalama 3ml ACD-B (acid citrate dextrose) tüplerine kan alınarak, platelet izolasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen plateletlerden mtDNA izolasyonu, standart fenol-kloroform yöntemine göre yapıldı. Elde edilen mtDNA'lar analiz için -80°C'de bekletildi.

Bisülfıt dönüşümü ve MSP: İzole edilen doku DNA'sının bisülfıt dönüşümü standardize edilmiş ticari kit (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit) ile gerçekleştirildi. Metilasyon analizleri için; PCR yöntemi ile mtDNA sitokrom c oksidaz (MT-CO1, MT-CO2, ve MT-CO3); tRNA lösin 1 (MT-TL1); ATP sentaz (MT-ATP6 and MT-ATP8); and NADH dehidrogenaz (MT-ND5) gen bölgeleri hasta ve kontrol gruplarından elde edilerek DNA dizi analizi yöntemi ile incelendi.

Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-15R)
- Mikropipet Seti (Finnpipette)
- Etüv (Nüve EN 055)
- Vorteks (Heidolph)
- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge 16)
- Buzdolabı (Beko 5034 NF)
- Derin Dondurucu (Beko 7125)
- Termal Cyclers (Peqlab Primus 25)
- Hassas Terazı (Ohaus)
- Mikrodalga Fırın (Beko MD-1610)
- Manyetik Karıştırıcı (Yellow Line MSH Basic)
- Elektroforez Tankı (Clever)

- Elektroforez Güç Kaynağı (Wealtec Elite 300 Plus)
- Jel Görüntüleyici (İntas Science İmaging)

Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

- 10×PCR Buffer
- 50-1000 bç DNA Ladder
- Agaroz
- Borik Asit
- d-NTP Mix
- Doymuş Fenol
- EDTA
- Etanol
- Etidyum Bromid
- İzoamil Alkol
- Kloroform
- MgCl₂
- Proteinaz K
- Potasyum Klorür
- Sodyum Dodesil Sülfat
- Sodyum Klorür
- Sodyum Asetat
- Steril Saf Su
- Taq DNA Polimeraz
- Tris Base
- Tris-Hidroklorid

➤ **STE Çözeltilisi**

Sodyum Klorür	100 mM
Tris. HCl	10 mM (pH:8.0)
Disodyum Edta	1 mM

Tablo 2. Kullanılan primer çiftleri

Gen	Primer Dizisi	Genomik Lokasyonu
MT-CO1	Forward 5' - TATTAATTGGTTTTTTAGGGTTTAT-3'	(GeneBank: J01415.2) 6736-6760
	Reverse 5' - CAACAAATCATTTTCATATTACTTCC-3'	(GeneBank: J01415.2) 6888-6912
MT-CO2	Forward 5'- TTTATGAGTTGTTTTTATATTAGGTTTAAA-3'	(GeneBank: J01415.2) 8068-8097
	Reverse 5' - ACTCCACAAATTTCAAACATTAAC -3'	(GeneBank: J01415.2) 8166-8190
MT-CO3	Forward 5' - TATATTATTTGTTTAAAAAGGTTTT -3'	(GeneBank: J01415.2) 9419-9443
	Reverse 5' - AATAAAAAACTCAAAAAATCCTAC-3'	(GeneBank: J01415.2) 9489-9513
MT-ATP6	Forward 5' - AAATAAAACATTTTTAATCTTAAAAC-3'	(GeneBank: J01415.2) 8879-8905
	Reverse 5' - CAACAAATCATTTTCATATTACTTCC-3'	(GeneBank: J01415.2) 6888-6912
MT-ATP8	Forward 5' - AAATTATAATAAATTTTGAGAATTTAAAATG- 3'	(GeneBank: J01415.2) 8500-8529
	Reverse 5' - AATAAACCTAAAATTATAAAAAACAATAAAT- 3'	(GeneBank: J01415.2) 8550-8579
MT-TL1	Forward 5' - TAGGGTTTGTTAAGATGGTAGAGTT-3'	(GeneBank: J01415.2) 3222-3246
	Reverse 5' - ACAATAAAAAATAAAAAATTAACCATAAAT-3'	(GeneBank: J01415.2) 3309-3338
MT-ND5	Forward 5' - GTGATATATAAATTTAGATTTAAATATTAA- 3'	(GeneBank: J01415.2) 12651-12680
	Reverse 5' - TAAACAAAAAAAATATAATTCCTAC-3'	(GeneBank: J01415.2) 12775-12799

DNA'nın Spektrofotometrik Analizi

DNA numunelerinin konsantrasyonu ve saflığını belirlemek için 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerleri Eppendorf® spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. DNA molekülü 260 nm'de azami absorpsiyonu vermektedir. Bu dalga boyunda okunan değer, çift sarmallı DNA molekülünün yaklaşık 50 µg/ml konsantrasyonunda 1.0 optik yoğunluğa (O.Y.) sahip olması temel bilgisine dayanılarak numunedeki nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanması esasına dayanır.

DNA Derişimi (µg/ml) = O.Y._{260 nm} x Seyreltme Faktörü

260 nm ve 280 nm arasındaki O.Y. değerleri arasındaki oran (O.Y._{260 nm} / O.Y._{280 nm} oranı) nükleik asit saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf DNA preparatlarında bu oran 1.8'dir. Daha yüksek veya düşük değerler, genellikle sırasıyla RNA, protein veya fenol kontaminasyonlarını gösterir. Protein veya fenol bulaşısı olmadan saf olarak DNA izolasyonu, çalışmamızın kritik basamaklarından birini teşkil etmektedir. Spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilen numunelerden O.Y._{260 nm} / O.Y._{280 nm} değeri 1,7'den aşağı ve 1,9'dan yukarı olan numuneler elendi ve yeniden izolasyon sürecine başlandı.

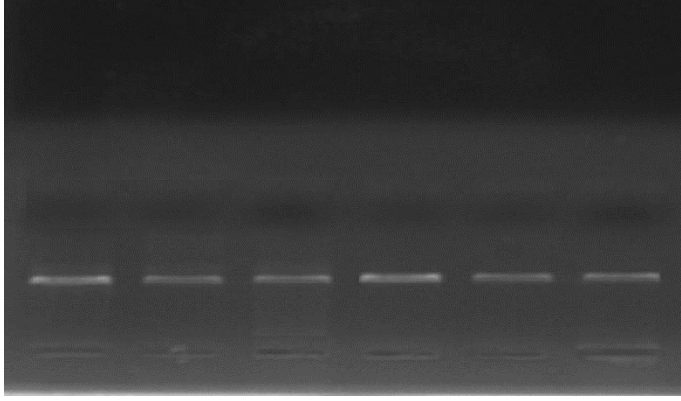
DNA'nın Agaroz Jel Elektforezi İle Saflık Kontrolü

Saflık tayini için DNA numuneleri %2'lik agaroz jel elektforezi ile de test edildi. Bu amaçla Wealtec® Elite 300 Plus model güç kaynağına bağlı Cleaver® marka yatay jel tepsili elektforez kabı kullanıldı.

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 0,6 gram toz agaroz hassas terazi ile tartıldı. Temiz bir erlene aktarıldı. Üzerine 30 ml 0,5X TBE (Tris-Borat-EDTA, pH8,3) tamponu eklendi. Erlen'in ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. Hafifçe karıştırıp Beko® MD-1610 mikrodalga fırına koyuldu. Ara ara kontrol ederek erlen içerisindeki agaroz kristallerinin eridiğinden emin olana kadar ortalama iki dakika ısıtıldı. Kristaller tamamen eriyip sulu fazın altında jel oluştuğunu görünce soğumaya bırakıldı. Heterojen soğumayı engellemek için doğrudan banko üzerinde soğumaya bırakılmadı. Solüsyon yaklaşık 60 °C'ye kadar soğuduğunda üzerine UV ışık altında bantların görülmesini sağlayan etidyum bromür'den 3 µl ilave edildi ve karışım yavaşça çalkalandı. Bu işlemler devam ederken, diğer yandan elektforez kabı,

tepsisi ve jel tarakları önce distile su ile ardından %70'lik etanol ile yıkanıp temizlendi. Tepsinin kenarlarına kauçuk bariyerler geçirildi ve üzerinde bulunan bölmelere jel tarakları yerleştirildi. Sıcak jel ve etidyum bromür karışımını içeren erlen, tepsinin 3-4 cm yukarisından tutularak kabın içerisine yavaşça döküldükten sonra jel üzerinde oluşan hava kabarcığı eğer var ise pipet ucu yardımıyla alınarak oda sıcaklığında 30-40 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.

Sürenin sonunda jelin iyice katılaştığını gözlemledikten sonra elektroforez tepsisinin kenarlarındaki kauçuk bariyerler çıkarıldı. Tepsi, yaklaşık 350 ml civarında 0.5X TBE tamponu ile doldurduğumuz yatay elektroforez tankına jelin üzerindeki kuyular negatif kutup olan katot'a bakacak şekilde yerleştirildi. Jelin üzerindeki tarak yavaşça ve dikkatli bir şekilde kaldırıldı. Jelin üzerini 1-1.5 mm kaplayacak şekilde bir miktar daha 0.5X TBE tamponu ilavesi yapıldı. Oluşan bir hava kabarcığı var ise pipet ucu yardımı ile alındı. DNA numunesi [5 µl (0,25-0,5 ng)] ve 1 µl yükleme tamponu (loading buffer), mikropipet ile birkaç defa çekip bırakmak suretiyle iyice karıştırıldı. Karışım (6 µl'lik), mikropipet yardımı ile jelin üzerindeki kuyulardan birine yüklendi. Her bir DNA numunesi için aynı işlem tekrar edilerek jelin üzerindeki kuyulara sıra ile yüklendi. En son sırada bulunan kuyuya elektroforez sonucu oluşan bantların yerinin net olarak gözlemlenmesini sağlayan 50-1000 baz çiftleri arasında belli aralıklarla kuvvetli bantlar veren DNA merdiveni yüklendi. Elektroforez kabının kapağı kapatıldı. Güç kaynağının elektroforez kabına kablo bağlantıları yapıldı. Güç kaynağı 90 volt'a ayarlanarak numuneler elektroforezde 30 dakika boyunca yürütüldü. Sürenin sonunda jel UV ışığı altında bilgisayar destekli İntaş® jel görüntüleme sistemi ile görüntülenip kayıt edildi. Jelin kuyularına yerleştirdiğimiz saf DNA, elektroforezde kuvvetli bir tek band şeklinde gözlenmektedir (**Şekil 4**). Elektroforez sonucunda jel üzerinde değişik bantlara ait leke ve izler bulunması DNA'nın bozunmaya uğradığını gösterir.



Şekil 4. Elektroforezde %2'lik agaroz jel'de 90 volt'ta 30 dakika yürütülen DNA örneklerinin görünümü.

PCR İşlemi

MtDNA sitokrom c oksidaz (MT-CO1, MT-CO2, ve MT-CO3); tRNA lösin 1 (MT-TL1); ATP sentaz (MT-ATP6 and MT-ATP8); and NADH dehidrogenaz (MT-ND5) gen bölgelerine ait tek bir bant elde edebilmek için PCR'de değişik parametreler test edildi. Bu parametreler arasında, MgCl₂'ün 1,0 ile 3,0 mM arasındaki konsantrasyonları, primer çiftlerinin 20 ile 100 pmol arasındaki konsantrasyonları ve kalıp DNA'nın 100, 200, 300 ve 500 ng gibi değişik konsantrasyonları ile çalışmaların yapılması yer almaktadır. İzlenen genel protokol Tablo 3'de, PCR ile çoğaltma programında kullanılan bileşenlerin ideal hacim ve konsantrasyonları tablo 4'de sunulmuştur.

Tablo 3. PCR işleminde kullanılan genel protokol.

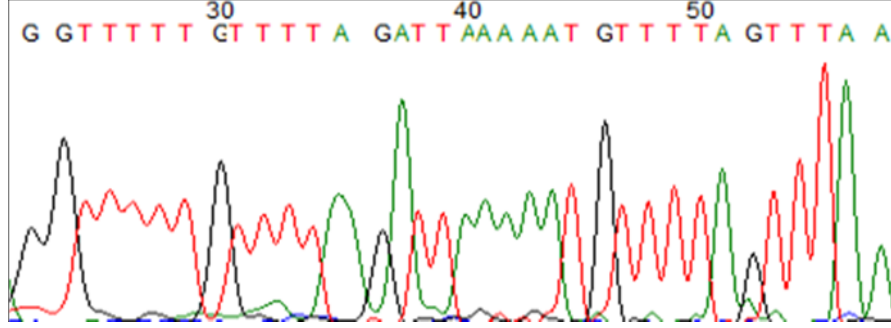
Denatürasyon	94 °C	1 dk	35 siklus
Primer eşleşmesi	55 °C	1 dk	
Zincir Uzaması	72 °C	1 dk	
Final Uzatması	72 °C	1 dk	

Tablo 4. MtDNA sitokrom c oksidaz (MT-CO1, MT-CO2, ve MT-CO3); tRNA lösin 1 (MT-TL1); ATP sentaz (MT-ATP6 and MT-ATP8); and NADH dehidrogenaz (MT-ND5) gen bölgelerinde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyondaki hacim ve konsantrasyonları

İçerik	Stok Konsantrasyon	Eklenecek Hacim	50 µl Reaksiyon Karışımındaki Konsantrasyon
Kalıp DNA	3 µl	3 µl	~4 ng/ µl
Tampon	10x	5 µl	1x
MgCl₂	25 Mm	3 µl	1,5 mM
dNTP Karışımı	10 Mm	1 µl	200 µM
Forward Primer	10 pmol/ µl	2 µl	20 pmol
Reverse Primer	10 pmol/ µl	2 µl	20 pmol
Taq DNA Polimeraz Enzimi	5 U/L	1 µl	5 U
Steril Su		50 µl'ye tamamlanır.	

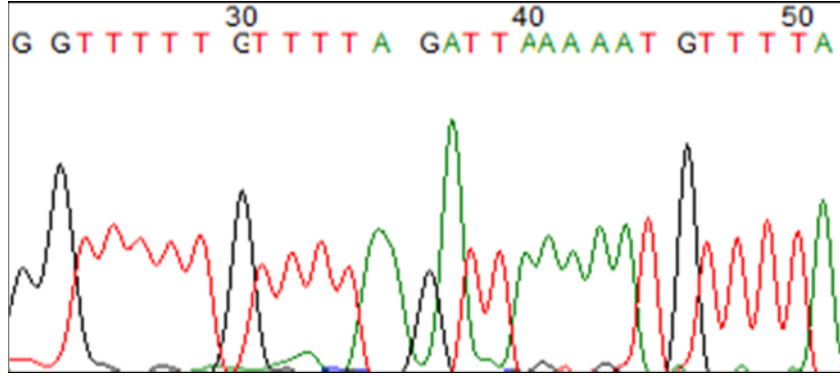
4. BULGULAR

4.1. Mitokondriyal DNA ATP-6 gen bölgesi



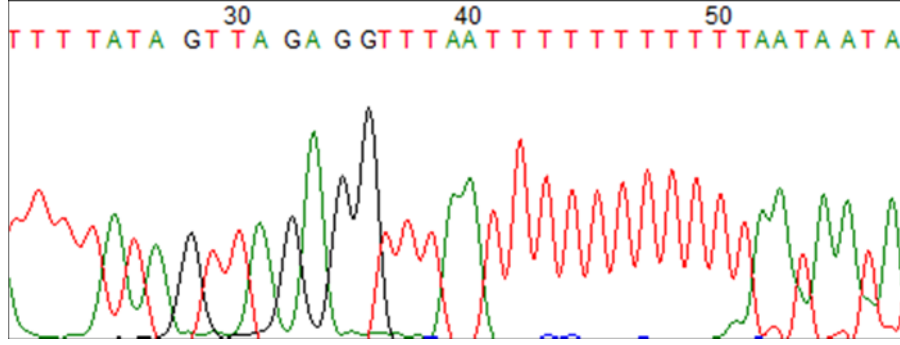
Şekil 5. Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.

4.2. Mitokondriyal DNA ATP-8 gen bölgesi



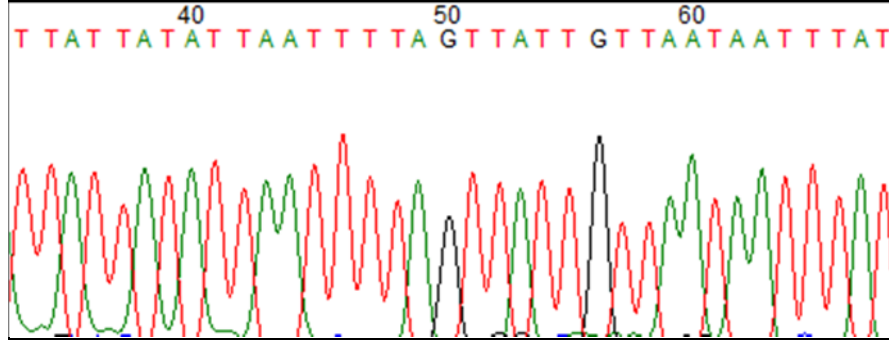
Şekil 6. Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.

4.3. Mitokondriyal DNA tRNA lösin 1 (MT-TL1) gen bölgesi



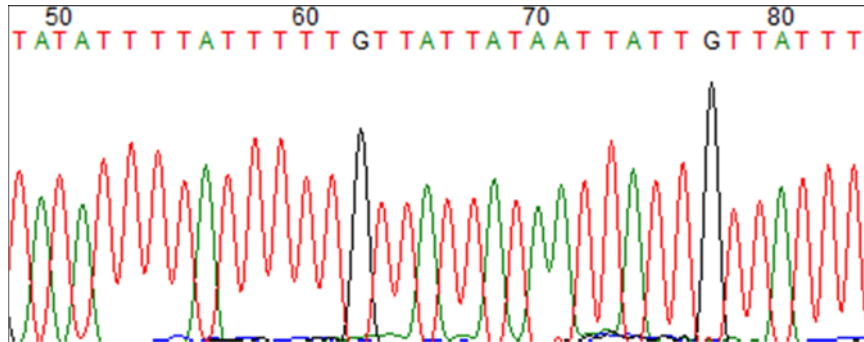
Şekil 7. Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.

4.4. Mitokondriyal DNA NADH dehidrogenaz (MT-ND5) gen bölgesi



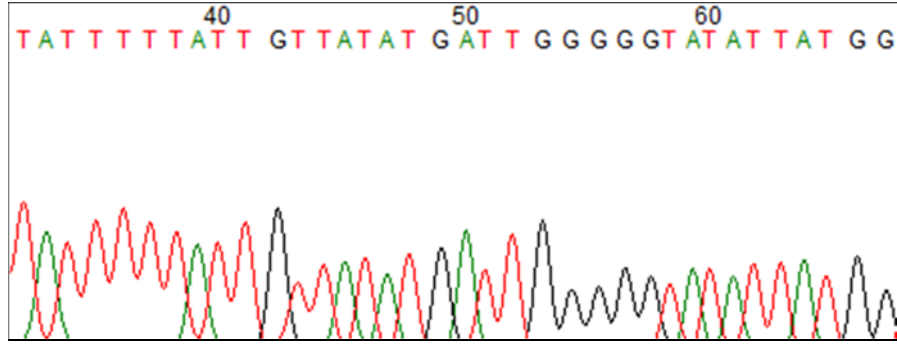
Şekil 8. Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.

4.5. Mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz (MT-CO1) gen bölgesi



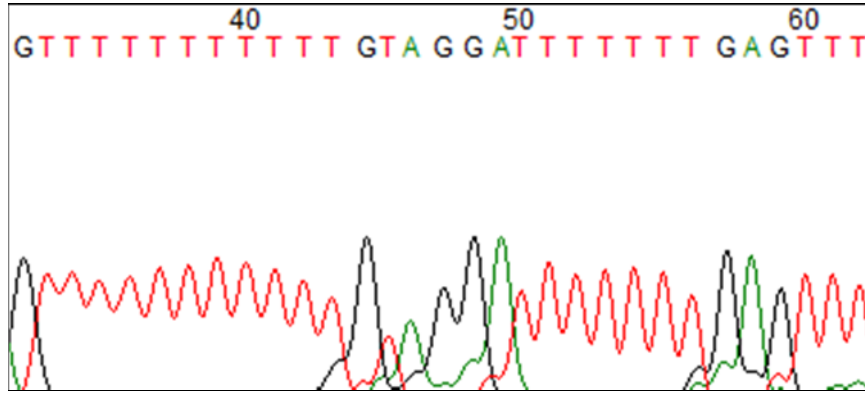
Şekil 9. Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.

4.6. Mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz (MT-CO2) gen bölgesi



Şekil 10. Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.

4.7. Mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz (MT-CO3) gen bölgesi



Şekil 11. Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizi sonucu. Hasta ve kontrol gruplarında metile olmamış nükleotid saptanmamıştır.

Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizinde, hem iskemik ve non-iskemik hasta gruplarında hem de kontrol grubunda, mitokondriyal DNA ATP-6, mitokondriyal DNA ATP-8, mitokondriyal DNA tRNA lösin 1, mitokondriyal DNA NADH dehidrogenaz (MT-ND5), mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz (MT-CO1), mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz (MT-CO2), mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz (MT-CO3) gen bölgelerinde metilasyon saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Dünyada kalp hastalıkları ile ilişkilendirilmiş olan ölümler, tüm nedenlere bağlı ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. Kardiyovasküler sistem kaynaklı mortalite ve morbiditede azalma sağlamak amaçlı bu konuda yapılan çok yönlü çalışmalar ile erken tanı ve etkin tedavi yöntemleri araştırılmıştır. Kalp yetmezliği, tanı ve tedavisinde gelişmeler olmasına karşın, yaşlı popülasyonun artması sebebiyle gün geçtikçe artan önemli bir kardiyovasküler mortalite ve morbidite sebebidir. Ayrıca sık başvuru gerektiren kronik bir hastalık olması ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle son yıllarda genetik araştırmalara da ağırlık verilmiştir.

Lindgren ve ark.'nın 2018 yılında İsveç'te yaptığı, kalp yetmezliğinin kalıtım ile ilişkisini amaçlayan çalışmada, evlatlık edinilen kişiler, biyolojik ebeveynleri ve evlat edinen ebeveynler arasındaki kalp yetmezliği ilişkisi incelenmiştir. Biyolojik ebeveyninde kalp yetmezliği bulunması, o kişi için kalp yetmezliği açısından bir risk faktörü olarak gösterilmiştir (88). Bu çalışma, genetik araştırmaların kalp yetmezliğinde ki önemini göstermektedir.

Epigenetik, DNA metilasyon modifikasyonu ve kromatin yeniden düzenlemesini kapsayan, DNA sekansında bir değişiklik olmaksızın meydana gelen gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmıştır (76). Son dönemde üzerinde en çok çalışılan ve hakkında en çok bilgi sahibi olunan epigenetik mekanizma DNA metilasyonu olmuştur. DNA metilasyonu, kovalent bir modifikasyondur ve sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH₃) takılması ve 5-metil sitozin (5m-C) yapısının oluşmasıyla karakterize edilir (79). Promotor bölgedeki metilasyon, gen ifadesi ile negatif korelasyona sahipken, gen içindeki metilasyonunun, gen ifadesi ile pozitif korelasyona sahip olmasının açıkça bir paradoks olduğu da vurgulanmıştır. Yani DNA metilasyonunun gen ifadesi üzerine etkilerinin hem baskılama hem de ifadeyi artırma yönünde olabileceği belirtilmiştir (83).

Baccarelli ve ark.'nın 2010 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, iskemik kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalık gruplarında, nükleer DNA metilasyonunda bazal

ile anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (13). Bu çalışmada, nükleer DNA metilasyonunun kalp hastalıklarını etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Movassagh M ve ark.'nın 2010 yılında yapmış olduğu çalışmada, dilate kardiyomiyopati hastalarının metile olmuş anjiyogenez ile ilişkili nükleer DNA gen ekspresyonunda normal hasta grubuna göre %2-5 oranında anlamlı farklılık saptanmıştır. Fakat bu DNA metilasyon değişikliklerinin kalp yetmezliğinin progresyonunda nedensel bir rol oynayıp oynamadığını belirlemek için daha fazla araştırma yapmak gerekmektedir (89).

Pepin ve ark.'nın 2018 yılında yapmış olduğu bir çalışmada ise iskemik ve non-iskemik kalp yetmezliği hastaları karşılaştırıldığında, DNA KLF15 gen metilasyonunun iskemik kalp yetmezliği ile ilişkisi desteklenmiştir ve DNA KLF15 geni, DNA hipermetilasyonu ile birlikte, koroner arter hastalığında kardiyak metabolizma ile ilişkili bir gen olarak tanımlanmıştır (90). Bu çalışma DNA metilasyonunun iskemik kalp hastalıklarıyla ilişkisi olabileceğini göstermiştir.

Mitokondri kalbin normal fonksiyonlarını koruyabilmesi için kritik bir role sahiptir ve mitokondriyal hastalıklar çeşitli kalp hastalıklarının patogenezinde yer almaktadır (91). Mitokondri, hücrel enerji üretim kaynağıdır ve kalp yüksek enerji talebi olan bir organdır; bu sebeple, mitokondri fonksiyon bozuklukları, ateroskleroz, hipertansiyon, kalp yetmezliği, kardiyak hipertrofi gibi kardiyovasküler hastalıklarla birlikte seyredebilir (92). Kalp yetmezliği tedavi hedefleri arasında, mitokondri biyogenezi, oksidatif stresi ve mitokondride demir kullanımı da gösterilmiştir (93). Ayrıca yine ateroskleroz ve kardiyomiyopati gelişmesinde, mitokondrinin düzenlediği apoptoz ve otofajideki sorunlarında rol oynadığı düşünülmektedir (94).

Her hücre tipi farklı sayıda ve farklı aktivasyon düzeyinde mitokondri içermektedir ve buna göre mtDNA metilasyonunun her hücre tipinde farklı olabileceği düşünülmektedir. Bundan dolayı mtDNA metilasyonunun hastalıklar üzerindeki etkisi incelenirken çalışmaların tek tip hücrede yapılmasının önemi vurgulanmaktadır.

Chen ve ark.'nın 2014 yılında, lökositlerdeki mtDNA miktarı ile kardiyovasküler hastalık riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmasında; lökositlerdeki mtDNA daha az olan hastalarda kardiyovasküler hastalık riski ve

aterosklerotik plak riskinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (95). Bu çalışma mtDNA miktarı ile kardiyovasküler hastalık riski arasında bir ilişkiyi olabileceğini göstermiştir.

Zhang ve ark.'nın 2017 yılında yapmış olduğu, mtDNA kopya sayısı ile ani kardiyak ölüm arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, ikisi arasında ters orantılı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (96). Yani mtDNA kopya sayısındaki artışın ani kardiyak ölümü azalttığı sonucuna varılmıştır.

Nükleer DNA metilasyonu yerleşmiş bir fikirdir ancak mtDNA metilasyonu son yıllarda kabul görmüş bir fikirdir. Metilazın omurgalılarının mitokondrisine ulaşamaması ve mtDNA'nın histonlardan yoksun, mitokondriyal membran ile çevrelenmiş nükleoid kümelerinden oluşması nedeniyle, mtDNA'nın metilasyona uğrayamayacağı görüşü hakimdir. Son yıllarda memeli mitokondrium fizyolojisinde metodolojik ve fonksiyonel yaklaşımlar mtDNA metilasyonunu kısmen tanımlamıştır, sonrasında kütle spektrometresi kullanılarak, insan mtDNA'sında metilatlı bazların varlığı kanıtlanmıştır ve mitokondride de metil transferaz (DNMT) olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mtDNA daki epigenetik değişikliklerin nDNA'yı, nDNA'daki epigenetik değişikliklerin de mtDNA'yı etkileyebileceği düşünülmeye başlanmıştır. Bazı çalışmalar sadece nükleer DNA'nın değil aynı zamanda mtDNA'nın da yaş, çevresel faktörler, ilaçlarla ilişkili olarak metilasyon gibi epigenetik modifikasyonlara maruz kalabileceğini desteklemektedir (17). Artık mtDNA metilasyonunun yeni jenerasyon biyomarker ve tanı aracı olarak gösterilmesi araştırmaların hedefi olmuştur. Atilano ve ark.'nın 2015 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, mtDNA metilasyonunun inflamasyon, anjiyogenez ve çeşitli sinyal yolları ve dolayısıyla bazı yaygın hastalıklar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (14). Biz bu çalışmada, platelet mtDNA metilasyonunun, kardiyovasküler hastalıklarda kullanabileceğimiz yeni bir tanı aracı olabileceğini göstermeyi amaçlamıştık.

Stocco ve ark.'nın 2018 yılında ALS (Amyotrofik Lateral Skleroz) gen mutasyonu taşıyıcısı olan kişilerde, mtDNA kopya sayısı ve D-loop bölge metilasyonunu inceleyen çalışmasında, ALS gen mutasyonu taşıyıcısı olan kişilerde

D-loop bölge demetilasyonunun, mtDNA kopya sayısında artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (97).

Budak ve ark.'nın 2015 yılında yaptığı, acil servise başvuran, akut kalp yetmezliği (AKY) olan ve olmayan hastalar arasında ortalama trombosit hacmi ile BNP düzeyi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmada AKY olan hastalarda anlamlı olarak yüksek BNP düzeyi ve yüksek ortalama trombosit hacmi saptanmıştır (98). Yani bu çalışma KY ile ortalama trombosit hacmi arasında bir ilişki olabileceğini göstermiştir.

Trombositler hem ateroskleroz patogeneğinde hem de akut trombotik olay sürecinde KVH için önemli bir role sahiptir (99). Hızlı ve karmaşık bir sinyal kaskadından sonra adezyon, agregasyon ile birlikte trombüs oluşumunda rol almaktadırlar. Ayrıca çok fazla mitokondri içerirler ve trombositlerdeki mitokondrielerin rolü önemlidir; aktivasyon ve sekresyon sırasında enerji talepleri artar (100,101). Trombositlerin nükleusu olmadığı için mitokondriyal genom bu hücrelerde tek genetik materyaldir. Diğer taraftan nükleer mtDNA'nın kopya sayısı trombosit mtDNA'ından daha fazladır. Bundan dolayı, trombositlerdeki mitokondriyal genlerin epigenetik regülasyonu ve KVH üzerine olan etkisi araştırmaların ilgi odağı olmuştur ve trombositlerdeki mtDNA metilasyonu potansiyel bir biyomarker olarak dikkat çekmektedir.

MtDNA metilasyonunun trombositlerdeki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Nükleer DNA metilasyonunda da olduğu gibi farklı doku ve hücre tiplerindeki, farklı metilasyon paternleri nedeniyle çalışmalarda çeşitli hücre tipleri kullanmak büyük bir sorundur (102-103). Periferik kandan yapılan DNA izolasyonu, trombositlerden yapılan mtDNA izolasyonundan daha kolay değildir. Ayrıca periferik kandan yapılan DNA izolasyonu çeşitli lökosit tiplerinden sağlandığı için metilasyon araştırılması bu çalışmalarda bir dezavantajdır. Yine lökositlerin kardiyovasküler hastalıklara spesifik olmaması da bu KVH (kardiyovasküler hastalıklar) ile ilgili yapılan çalışmalar için bir dezavantaj olacaktır (16). Trombositlerin tek tip hücre olması ve kolay izole edilebilmesi KVH ile ilgili yapılan çalışmalar için bir avantajdır. Dahası trombositlerdeki mtDNA metilasyonu ile DNA

metilasyonu karşılaştırıldığında trombositlerdeki metilasyonun daha homojen olduğu gösterilmiştir (104).

Chou ve ark.'nın 2018 yılında, kalp yetmezliği olan hastalar ve sağlıklı iki grup arasında yaptığı bir çalışmada ise, kalp yetmezliği olan grupta trombositlerdeki mitokondride oksijen tüketim hızı kompleks 1 (ND) ve 2 de anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (105). Bu çalışma, kalp yetmezliği hastalarında trombositlerdeki mtDNA' da kompleks 1 ve 2 genlerinin daha aktif olduğunu, dolayısıyla kalp yetmezliği çalışmalarında trombositlerdeki bu genleri araştırmamızın anlamlı olabileceğini göstermiştir.

Sitokrom C oksidaz genleri özellikle kalp gibi yüksek enerji talebi olan dokularda ölümcül metabolik hastalıklar ve mitokondriyal hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (106). Ek olarak trombositlerdeki düşük sitokrom C oksidaz aktivitesi, genel olarak kardiyak disfonksiyonla ortaya çıkan mortal seyreden sepsisle ilişkili bulunmuştur (107). Diğer taraftan sitokrom C oksidaz genlerindeki yüksek aktivasyon ise kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili bulunmuştur (16).

Qin ve ark.'nın 2016 yılında, kardiyopulmoner bypass ile yapılan kardiyak cerrahi sonrası plazmadaki mitokondriyal DNA artışının trombosit aktivasyonu ile ilişkisini incelemiştir. İnflamatuar süreçle ilişkilendirilen bu çalışmada trombosit sayısı ve aktivasyonundaki artışla, plazma mtDNA miktarındaki artış ilişkili ve anlamlı bulunmuştur. MtDNA'nın trombosit kaynaklı olduğu öne sürülmüştür (108). Bu çalışma, kardiyovasküler hastalıklarda mtDNA metilasyon araştırmalarının, trombositlerdeki mtDNA ile yapılmasının anlamlı olabileceğini göstermiştir.

Biz çalışmamızda, trombositlerdeki mtDNA'nın artmış metilasyonunun, iskemik ve non-iskemik kalp yetmezliği etyolojisinde tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmayı amaçladık. Trombositlerdeki mtDNA metilasyon analizi, mtDNA'nın ATP sentezi (sitokrom c oksidaz, ATP sentaz, NADH dehidrogenaz ve tRNA lösin) ile ilişkisinden faydalanılarak yapılmıştır.

Baccarelli ve ark.'nın 2015 yılında yaptığı, bizim çalışmamıza benzer bir çalışmada, sağlıklı kontrol grubuna göre kardiyovasküler hasta grubunda platelet

mtDNA da CO-1,2,3 ve taşıyıcı RNA (tRNA) lösin 1'de daha yüksek oranda metilasyon saptanmış, anlamlı bulunmuş ve hastalık grubundaki metilasyon paternleri benzerlik göstermiştir; fakat ATP 6-8 ve ND5 metilasyonunda anlamlı bir fark bulunamamıştır. MT-CO1 DNA metilasyonu kontrol grubunda %4,45, hasta grubunda %22,9, MT-CO2 DNA metilasyonu kontrol grubunda %1,22, hasta grubunda %4,55, MT-CO3 DNA metilasyonu kontrol grubunda %0,58, hasta grubunda %1,5, MT-TL1 DNA metilasyonu kontrol grubunda %2,57, hasta grubunda %4,24 saptanmıştır. Ayrıca yaş, ırk, vücut kitle indexi ile plateletlerdeki mtDNA metilasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (16). 2015 yılında yapılan bu çalışma trombosit mtDNA metilasyonu ile KVH arasındaki ilişkiyi araştıran ilk ve tek çalışmadır. Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları vardır. Örneklem büyüklüğü diğer çalışmalara kıyasla nispeten k c kt r; 17 kişi kontrol grubunda, 10 kişi hasta grubunda yer almıştır. Ayrıca kalp yetmezliği gibi spesifik bir hasta popülasyonu seçilmemiştir; hipertansiyon, hiperlipidimi, ateroskleroz gibi daha geniş bir profilde kardiyovasküler hastalıkların bulunduğu hasta popülasyonu seçilmiştir.

Bizim alışmamızda, Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizinde, hem iskemik ve non-iskemik hasta gruplarında hem de kontrol grubunda, CO-1,2,3, tRNA lösin 1, ATP 6-8 ve ND5 gen bölgelerinde metilasyon saptanmamıştır. Çalışmamızın sonucuna göre kalp yetmezliği ile trombosit mtDNA metilasyonu arasında bir ilişki yoktur. Baccarelli ve ark.'nın 2015 yılında yaptığı çalışmayla kıyasladığımızda, bizim çalışmamızda hasta sayısı nispeten daha fazladır. Diğer bir konu ise biz daha spesifik bir hasta grubu ile çalıştık, çalışmamıza sadece kalp yetmezliği bulunan hastaları aldık.

Trombositlerdeki mtDNA metilasyon profilinin, iskemik ve non-iskemik kalp yetmezliği etyolojisinde tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağının anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kalp yetmezliğinin multifaktöriyel bir hastalık olması, epidemiyolojik farklılıklar ve diğer çalışmalara kıyasla hasta sayımızın nispeten az olması çalışmamızın sonuçlarını etkilemiş olabilir. Çalışmamızın bazı teknik kısıtlılıkları da olmuştur. Santrifüj ile trombositlerin serbest nükleer DNA ve serbest mitokondrilerden izolasyonundaki zorluktan bahsedebiliriz. Ekstrakte edilen

trombosit mtDNA'larında serbest nükleer DNA ve nükleer mtDNA'ların az miktarda kontaminasyonunun olma olasılığını göz ardı edemeyiz.

MtDNA metilasyonunun trombositlerdeki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Fakat trombositlerin tek tip hücre olması ve kolay izole edilebilmesi, KVH ile ilgili yapılacak olan diğer çalışmalara fikir vermesi açısından önemli olabilir. Çalışmamız henüz araştırılma aşamasında olan bir konu ile ilgili olduğu için ve bu konuyla ilgili çok az sayıda çalışma olduğu için, trombosit mtDNA metilasyon profilinin kardiyovasküler hastalıklarda tanı aracı olmasıyla ilgili netlik kazanması açısından daha fazla çalışmaya ve fikir birliğine gereksinim vardır.

6. SONUÇ

Biz çalışmamızda, trombositlerdeki mtDNA'nın artmış metilasyonunun, iskemik ve non-iskemik kalp yetmezliği etyolojisinde tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmayı amaçladık. Trombositlerdeki mtDNA metilasyon analizi, mtDNA'nın ATP (adenozin trifosfat) sentezi ile ilişkisinden faydalanılarak yapılmıştır. Bu bağlamda analizi yapılan genler; sitokrom c oksidaz (CO), ATP sentaz, NADH dehidrogenaz (ND) ve taşıyıcı RNA (tRNA) l6sin 1'dir. Çalışmamızda, Metilasyon Spesifik PCR DNA Dizi Analizinde, hem iskemik ve non-iskemik hasta gruplarında hem de kontrol grubunda, CO-1,2,3, tRNA l6sin 1, ATP 6-8 ve ND5 gen b6lgelerinde metilasyon saptanmamıştır. Çalışmamızın sonucuna g6re kalp yetmezliği ile trombosit mtDNA metilasyonu arasında bir ilişki yoktur. MtDNA metilasyonunun trombositlerdeki rol6 hen6z tam olarak açıklanamamıştır. Fakat trombositlerin tek tip h6cre olması ve kolay izole edilebilmesi, KVH ile ilgili yapılacak olan diğer çalışmalara fikir vermesi açısından 6nemli olabilir. Çalışmamız hen6z araştırılma aşamasında olan bir konu ile ilgili olduğu için ve bu konuyla ilgili çok az sayıda çalışma olduğu için, trombositlerdeki mtDNA metilasyon profilinin, iskemik ve non-iskemik kalp yetmezliği etyolojisinde tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağı ile ilgili daha fazla çalışmaya ve fikir birliğine gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Wang TJ. Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community. *Circulation* 2003;108:977-982.
2. Senni M, Tribouillois CM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Evans JM, Bailey KR, et al. Congestive heart failure in the community: trends in incidence and survival in a 10-year period. *Arch Intern Med* 1999;159(1):29-34.
3. Sanderson JE, Tse TF. Heart failure: a global disease requiring a global response. *Heart* 2003;89:585-586.
4. Mair FS, Crowley TS, Bundred PE. Prevalence, aetiology and management of heart failure in general practice. *Br J General Practice* 1996;46:77-79.
5. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Reviews* 2000;5:167-173.
6. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, et al. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart Journal* 1997;18:208-225.
7. Campbell DJ. Heart failure: how can we prevent the epidemic? *Med J Australia* 2003;179:422-425.
8. Funk M, Krumholz HM. Epidemiologic and economic impact of advanced heart failure. *J Cardiovasc Nursing* 1996;10:1-10.
9. Happ MB, Naylor MD, Roe-Prior P. Factors contributing to rehospitalization of elderly patients with heart failure. *J Cardiovasc Nursing* 1997;11:75-84.
10. Cline C, Israelsson B, Willenheimer R, Broms K, Erhardt LR. Cost effective management programme for heart failure reduces hospitalization. *Heart* 1998;80:442-447.
11. Kasper EK, Gerstenblith G, Hefter G, Anden EV, Brinker JA, Thiemann DR, et al. A randomized trial of the efficacy of multidisciplinary care in heart failure

- outpatients at high risk of hospital readmission. *J Am Coll Cardiology* 2002;39:471-480.
12. Huang J, Tan L, Shen R, Zhang L, Zuo H, Wang DW. Decreased Peripheral Mitochondrial DNA Copy Number is Associated with the Risk of Heart Failure and Long-term Outcomes. *Medicine (Baltimore)* 2016 Apr;95(15):e3323.
 13. Baccarelli A, Wright R, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, Tarantini L, et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology* 2010;21(6):819–28.
 14. Atilano SR, Malik D, Chwa M, Caceres-Del-Carpio J, Nesburn AB, Boyer DS, et al. Mitochondrial DNA variants can mediate methylation status of inflammation, angiogenesis and signaling genes. *Human Molecular Genetics* 2015;1–13.
 15. Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* 2012;251-255.
 16. Baccarelli A, Byun HM. Platelet mitochondrial DNA methylation: a potential new marker of cardiovascular disease. *Clinical Epigenetics* 2015;7:44.
 17. Iacobazzi V, Castegna A, Infantino V, Andria G. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool. *Molecular Genetics and Metabolism* 2013;110, 25–34.
 18. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm* 2011;8:1308–1339.
 19. Fonarow GC, Stough WG, Abraham WT, Albert NM, Gheorghide M, Greenberg BH, et al. Characteristics, treatments and outcomes of patients with

- preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:768–77.
20. Marwick TH, Raman SV, Carrio I, Bax JJ. Recent developments in heart failure imaging. *JACC Cardiovasc Imaging* 2010;3:429–439.
 21. Paterson DI, O’Meara E, Chow BJ, Ukkonen H, Beanlands RS. Recent advances in cardiac imaging for patients with heart failure. *Curr Opin Cardiol* 2011;26:132–143.
 22. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:e1–90.
 23. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* 2008;10:933–989.
 24. 24. Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC). The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur Heart J* 2012;33(14):1750-1757.
 25. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More ‘malignant’ than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3:315–322.
 26. Stewart S, Ekman I, Ekman T, Oden A, Rosengren A. Population impact of heart failure and the most common forms of cancer: a study of 1 162 309 hospital

- cases in Sweden (1988 to 2004). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2010;3:573–580.
27. Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, Lewsey JD, Stewart S, Redpath A, et al. Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* 2009;119:515–523.
 28. Francis GS, Tang WH. Pathophysiology of congestive heart failure. *Rev Cardiovasc Med.* 2003;4 Suppl 2:S14-20.
 29. McMurray JJ. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med.* 2010;362:228–238.
 30. Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet* 2011;378:704–712.
 31. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2012;33:1787–847
 32. Davie AP, Francis CM, Caruana L, Sutherland GR, McMurray JJ. Assessing diagnosis in heart failure: which features are any use? *QJM* 1997;90:335–339.
 33. Mant J, Doust J, Roalfe A, Barton P, Cowie MR, Glasziou P, et al. Systematic review and individual patient data meta-analysis of diagnosis of heart failure, with modelling of implications of different diagnostic strategies in primary care. *Health Technol Assess* 2009;13:1–207, iii.
 34. Oudejans I, Mosterd A, Bloemen JA, Valk MJ, van Velzen E, Wielders JP, et al. Clinical evaluation of geriatric outpatients with suspected heart failure: value of symptoms, signs, and additional tests. *Eur J Heart Fail* 2011;13:518–527.
 35. Fonseca C. Diagnosis of heart failure in primary care. *Heart Fail Rev* 2006;11:95–107.

36. Kelder JC, Cramer MJ, van Wijngaarden J, van Tooren R, Mosterd A, Moons KG, et al. The diagnostic value of physical examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure. *Circulation* 2011;124:2865–2873.
37. Rutten FH, Moons KG, Cramer MJ, Grobbee DE, Zuithoff NP, Lammers JW, et al. Recognising heart failure in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease in primary care: cross sectional diagnostic study. *BMJ* 2005;331:1379.
38. Hawkins NM, Petrie MC, Jhund PS, Chalmers GW, Dunn FG, McMurray JJ. Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: diagnostic pitfalls and epidemiology. *Eur J Heart Fail* 2009;11:130–139.
39. Daniels LB, Clopton P, Bhalla V, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, et al. How obesity affects the cut-points for B-type natriuretic peptide in the diagnosis of acute heart failure. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am Heart J* 2006;151:999–1005.
40. Ewald B, Ewald D, Thakkinstian A, Attia J. Meta-analysis of B type natriuretic peptide and N-terminal pro B natriuretic peptide in the diagnosis of clinical heart failure and population screening for left ventricular systolic dysfunction. *Intern Med J* 2008;38:101–113.
41. Doust JA, Glasziou PP, Pietrzak E, Dobson AJ. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. *Arch Intern Med* 2004;164:1978–1984.
42. Zaphiriou A, Robb S, Murray-Thomas T, Mendez G, Fox K, McDonagh T, et al. The diagnostic accuracy of plasma BNP and NTproBNP in patients referred from primary care with suspected heart failure: results of the UK natriuretic peptide study. *Eur J Heart Fail* 2005;7:537–541.

43. Maisel A, Mueller C, Adams K Jr, Anker SD, Aspromonte N, Cleland JG, et al. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail* 2008;10:824–839.
44. Fuat A, Murphy JJ, Hungin AP, Curry J, Mehrzad AA, Hetherington A, et al. The diagnostic accuracy and utility of a B-type natriuretic peptide test in a community population of patients with suspected heart failure. *Br J Gen Pract* 2006;56:327–333.
45. Yamamoto K, Burnett JC Jr, Bermudez EA, Jougasaki M, Bailey KR, Redfield MM. Clinical criteria and biochemical markers for the detection of systolic dysfunction. *J Card Fail* 2000;6:194–200.
46. Cowie MR, Struthers AD, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, et al. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet* 1997;350:1349–1353.
47. Krishnaswamy P, Lubien E, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Wanner E, et al. Utility of B-natriuretic peptide levels in identifying patients with left ventricular systolic or diastolic dysfunction. *Am J Med* 2001;111:274–279.
48. Kelder JC, Cowie MR, McDonagh TA, Hardman SM, Grobbee DE, Cost B, et al. Quantifying the added value of BNP in suspected heart failure in general practice: an individual patient data meta-analysis. *Heart* 2011;97: 959–963.
49. Kelder JC, Cramer MJ, Verweij WM, Grobbee DE, Hoes AW. Clinical utility of three B-type natriuretic peptide assays for the initial diagnostic assessment of new slow-onset heart failure. *J Card Fail* 2011;17:729–734.
50. Gustafsson F, Steensgaard-Hansen F, Badskjaer J, Poulsen AH, Corell P, Hildebrandt P. Diagnostic and prognostic performance of N-terminal proBNP in primary care patients with suspected heart failure. *J Card Fail* 2005;11:S15–S20.
51. Nielsen OW, Rasmussen V, Christensen NJ, Hansen JF. Neuroendocrine testing in community patients with heart disease: plasma N-terminal proatrial natriuretic

peptide predicts morbidity and mortality stronger than catecholamines and heart rate variability. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64:619–628.

52. Kozan Ö, Zoghi M, Ercan E, Tengiz İ, Şentürk T, Serdar OA. *Temel Kardiyoloji*, bölüm 10, 577-90, (2011).
53. Keleş İ, Gürgün C, İlerigelen B, Eren B. ve diğ. *Kalp Yetersizliğine Güncel Bakış*, bölüm 2-4, p:33-71, (2014).
54. Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, et al. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;28:2539–2550.
55. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2010;23:685–713; quiz 786–688.
56. Dokainish H, Nguyen JS, Bobek J, Goswami R, Lakkis NM. Assessment of the American Society of Echocardiography-European Association of Echocardiography guidelines for diastolic function in patients with depressed ejection fraction: an echocardiographic and invasive haemodynamic study. *Eur J Echocardiogr* 2011;12:857–864.
57. Kirkpatrick JN, Vannan MA, Narula J, Lang RM. Echocardiography in heart failure: applications, utility, and new horizons. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:381–396.
58. Lancellotti P, Moura L, Pierard LA, Agricola E, Popescu BA, Tribouilloy C, et al. European Association of Echocardiography recommendations for the

- assessment of valvular regurgitation. Part 2: mitral and tricuspid regurgitation (native valve disease). *Eur J Echocardiogr* 2010;11:307–332.
59. Lancellotti P, Tribouilloy C, Hagendorff A, Moura L, Popescu BA, Agricola E, et al. European Association of Echocardiography recommendations for the assessment of valvular regurgitation. Part 1: aortic and pulmonary regurgitation (native valve disease). *Eur J Echocardiogr* 2010;11:223–244.
 60. Popescu BA, Andrade MJ, Badano LP, Fox KF, Flachskampf FA, Lancellotti P, et al. European Association of Echocardiography recommendations for training, competence, and quality improvement in echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 2009;10:893–905.
 61. Nagueh SF, Bhatt R, Vivo RP, Krim SR, Sarvari SI, Russell K, et al. Echocardiographic evaluation of hemodynamics in patients with decompensated systolic heart failure. *Circ Cardiovasc Imaging* 2011;4:220–227.
 62. Sicari R, Nihoyannopoulos P, Evangelista A, Kasprzak J, Lancellotti P, Poldermans D, et al. Stress echocardiography expert consensus statement: European Association of Echocardiography (EAE) (a registered branch of the ESC). *Eur J Echocardiogr* 2008;9:415–437.
 63. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 2006;7:79–108.
 64. Schwitter J. Extending the frontiers of cardiac magnetic resonance. *Circulation* 2008;118:109–112.
 65. Raman SV, Simonetti OP. The CMR examination in heart failure. *Heart Fail Clin* 2009;5:283–300, v.
 66. Schwitter J, Arai AE. Assessment of cardiac ischaemia and viability: role of cardiovascular magnetic resonance. *Eur Heart J* 2011;32:799–809.

67. Wijns W, Kolh P, Danchin N, Di Mario C, Falk V, Folliguet T, et al. Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J* 2010;31:2501–2555.
68. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry* (2nd ed). New York: Worth Pub 1993.
69. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijin MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290: 457–465.
70. Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torron A, Yang CC, Wallace DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 1992;130:163-173.
71. Giles RE, Blanc H, Cann HM and Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1980;77:6715-6719.
72. Hess JF, Parisi MA, Bennett JL, Clayton DA. Impairment of mitochondrial termination by point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1991;351:236-239.
73. Higgins DG, Sharp PM. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 1988;73:237-244.
74. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev. Biochem* 1992;61:1175-1212.
75. Karaçay B. Kalıtımın Yeni Boyutu: Epigenetik. *Bilim ve Teknik Dergisi* 2009;505,32-37
76. Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL. Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. *Reprod. Toxicol* 2007;23:297-307.
77. Jiang Y, Bressler J, Beaudet LA. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genet* 2004; 5: 479-510.

78. Rodenheiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006;174(3):341-8.
79. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
80. Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports* 2011;12:647-56.
81. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013;14:204-20.
82. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(6):3740-5.
83. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012;13:484-92.
84. Helmann A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 2007;315:1141-43.
85. Gupta R, Nagarajan A, Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *BioTechniques* 2010; 49: 3-13.
86. Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 576-81.
87. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
88. Lindgren MP, PirouziFard M, Smith JG, Sundquist J, Sundquist K, Zöller B. A Swedish Nationwide Adoption Study of the Heritability of Heart Failure. *JAMA Cardiol.* 2018;3(8):703-710.

89. Movassagh M, Choy MK, Goddard M, Bennett MR, Down TA, Foo RS. Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure. *PLoS One* 2010;5(1), e8564.
90. Pepin ME, Ha CM, Crossman DK, Litovsky SH, Varambally S, Barchue JP, et al. Genome-wide DNA methylation encodes cardiac transcriptional reprogramming in human ischemic heart failure. *Lab invest* 2018;10.1038/s41374-018-0104-x.
91. Griffiths EJ. Mitochondria and heart disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:249–67.
92. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM, et al. Mitochondria and cardiovascular diseases-from pathophysiology to treatment. *Ann Transl Med.* 2018;6(12):256.
93. Bayeva M, Gheorghide M, Ardehali H. Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(6):599-610.
94. Dominic EA, Ramezani A, Anker SD, Verma M, Mehta N, Rao M. Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease. *Heart* 2014;100(8):611-8.
95. Chen S, Xie X, Wang Y, Gao Y, Xie X, Yang J, et al. Association between leukocyte mitochondrial DNA content and risk of coronary heart disease: a case-control study. *Atherosclerosis* 2014;237(1):220-6.
96. Zhang Y, Guallar E, Ashar FN, Longchamps RJ, Castellani CA, Lane J, et al. Association between mitochondrial DNA copy number and sudden cardiac death: findings from the Atherosclerosis Risk in Communities study (ARIC). *Eur Heart J.* 2017;38(46):3443-3448.
97. Stocco A, Mosca L, Carnicelli V, Cavallari U, Lunetta C, Marocchi A, et al. Mitochondrial DNA copy number and D-loop region methylation in carriers of amyotrophic lateral sclerosis gene mutations. *Epigenomics.* 2018.

98. Budak YU, Huysal K, Demirci H. Correlation between mean platelet volume and B-type natriuretic peptide concentration in emergency patients with heart failure. *Biochem Med (Zagreb)* 2015;25(1):97-102.
99. Bauereisen E, Hauck G, Jacob R, Peiper U. Enddiastolic pressure-volume relationships and the work diagram of the intact heart during natural circulation depending on heart frequency, adrenalin effect and vagus stimulation. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1964;281:216–30.
100. Akkerman JW, Holmsen H, Loughnane M. Simultaneous measurement of aggregation, secretion, oxygen uptake, proton production, and intracellular metabolites in the same platelet suspension. *Anal Biochem* 1979;97(2):387–93.
101. Akkerman JW, Holmsen H. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca²⁺ secretion. *Blood* 1981;57(5):956–66.
102. Houseman A, Accomando P, Koestler C, Christensen C, Marsit J, Nelson H, et al. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics* 2012;13:86.
103. Jaffe AE, Irizarry RA. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biol.* 2014;15(2):R31.
104. Byun HM, Panni T, Motta V, Hou L, Nordio F, Apostoli P, et al. Effects of airborne pollutants on mitochondrial DNA methylation. *Part Fibre Toxicol* 2013;10:18.
105. Chou CH, Fu TC, Tsai HH, Hsu CC, Wang CH, Wang JS. High-intensity interval training enhances mitochondrial bioenergetics of platelets in patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2018;S0167-5273(18)30650-8.
106. Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J, Houstek J. Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res.* 2004;53 Suppl 1:S213–23.

107. Lorente L, Martin MM, Lopez-Gallardo E, Iceta R, Blanquer J, Sole-Violan J, et al. Higher platelet cytochrome oxidase specific activity in surviving than in non-surviving septic patients. *Crit Care* 2014;18(3):R136.
108. Qin C, Gu J, Hu J, Qian H, Fei X, Li Y, et al. Platelets activation is associated with elevated plasma mitochondrial DNA during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Surg.* 2016;11(1):90.