



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



**KALP YETMEZLİKLİ KÖPEKLERDE HEMOSTAZİSİN  
DEĞERLENDİRİLMESİNE YENİ BİR YAKLAŞIM:  
PLATELET PROTEOMİK PROFİLİ**

Pınar LEVENT

DOKTORA TEZİ

BURSA-2019





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



**KALP YETMEZLİKLİ KÖPEKLERDE HEMOSTAZİSİN  
DEĞERLENDİRİLMESİNE YENİ BİR YAKLAŞIM:  
PLATELET PROTEOMİK PROFİLİ**

**Pınar LEVENT**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. Zeki YILMAZ**

**U.Ü. B.A.P. – DDP(v)2017/6**

**BURSA-2019**

**T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum “Kalp Yetmezlikli Köpeklerde Hemostazisin Değerlendirilmesine Yeni Bir Yaklaşım: Platelet Proteomik Profili ” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Pınar LEVENT**  
**Tarih ve İmza**

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Veteriner İç Hastalıkları Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Pınar LEVENT tarafından hazırlanan Kalp Yetmezlikli Köpeklerde Hemostazisin Değerlendirilmesine Yeni Bir Yaklaşım: Platelet Proteomik Profili konulu Doktora tezi 28/01/2019 Pazartesi günü, 11:00-13:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
<b>Tez Danışmanı</b>	Prof. Dr. Zeki YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Ebru YALÇIN	
Üye	Prof. Dr. Hakan SALCI	
Üye	Prof. Dr. M. Erman OR	
Üye	Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU  
Enstitü Müdürü

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

.../.../20....

**Adı Soyadı:** Pınar LEVENT

**Anabilim Dalı:** Veteriner İç Hastalıkları

**Tez Konusu:** Kalp Yetmezlikli Köpeklerde Hemostazisin Değerlendirilmesine Yeni Bir Yaklaşım: Platelet Proteomik Profili

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

### DANIŞMAN ONAYI

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. Zeki YILMAZ

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

<b>DIŞ KAPAK</b>	
<b>İÇ KAPAK</b>	
<b>ETİK BEYANI</b> .....	<b>II</b>
<b>KABUL ONAY</b> .....	<b>III</b>
<b>TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>TÜRKÇE ÖZET</b> .....	<b>VII</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Kalp Yetmezliği</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Tanım .....	3
2.1.2. Etiyoloji .....	3
2.1.3. Kalp Yetmezliği Tipleri.....	4
2.1.4. Kalp Yetmezliği Patofizyolojisi .....	5
2.1.5. Kardiyak Kompenzatuvar Mekanizmalar .....	5
2.1.6. Kalp Yetmezliğinin Klinik Belirtileri.....	7
2.1.7. Kalp Yetmezliğinin Tanısı ve Sınıflandırması .....	8
2.1.8. Kalp Yetmezliği Tedavisi.....	12
<b>2.2. Hemostazis</b> .....	<b>13</b>
2.2.1. Tanım .....	13
2.2.2. Hemostaziste Rol Oynayan Faktörler .....	13
2.2.3. Hemostazis Basamakları.....	13
2.2.4. Hemostazis-Tanısal Yaklaşım.....	16
<b>2.3. Proteomik</b> .....	<b>19</b>
2.3.1. Tanım .....	19
2.3.2. Proteomik ve Biyobelirteç Geliştirme .....	20
<b>2.4. Kalp Yetmezliği ve Platelet Proteom İlgisi</b> .....	<b>21</b>
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Hayvan Materyali</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2. Materyal Seçimi</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3. Çalışma Dışında Bırakma Kriterleri</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4. Kalp Yetmezliği Tanımlaması</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5. Örneklerin Toplanması ve Ölçümler</b> .....	<b>29</b>
3.5.1. Klinik Muayene .....	29
3.5.2. Radyolojik Muayene.....	29
3.5.3. Elektrokardiyografi.....	29
3.5.4. Ekokardiyografi .....	30
3.5.5. Laboratuvar Analizleri .....	32
3.5.5.1. Hematoloji.....	32
3.5.5.2. Koagülasyon (Hemostazis) Değerlendirilmesi .....	32
3.5.5.3. Serum Biyokimyasal Analizler .....	33
3.5.5.4. Platelet İzolasyonu .....	33
<b>3.6. Örneklerin Saklanması</b> .....	<b>36</b>
<b>3.7. Proteomik Çalışmalar</b> .....	<b>36</b>
<b>3.8. İstatistik Yöntemler</b> .....	<b>40</b>

<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1. Klinik Bulgular</b> .....	<b>41</b>
4.1.1. Fiziksel Muayene Bulguları.....	41
4.1.2. Tansiyon Ölçümleri.....	42
4.1.3. Radyografi .....	42
4.1.4. Elektrokardiyografi.....	42
4.1.5. Ekokardiyografi .....	42
<b>4.2. Laboratuvar Bulguları</b> .....	<b>44</b>
4.2.1. Hematolojik Bulgular... ..	44
4.2.2. Serum Biyokimyasal Bulgular.....	44
4.2.3. Hemostazis Değerlendirilmesi.....	45
<b>4.3. Platelet Proteomik Bulguları</b> .....	<b>46</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>87</b>
5.1. Kalp Yetmezliği ve Klinik Süreç .....	87
5.2. Kalp Yetmezliği ve Hemogram.....	94
5.3. Kalp Yetmezliği ve Organ-Doku Hasar Belirteçleri.....	97
5.4. Kalp Yetmezliği ve Hemostazis .....	101
5.5. Kalp Yetmezliği ve Platelet Proteomları .....	104
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>114</b>
<b>7. SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>123</b>
<b>8. EKLER</b> .....	<b>126</b>
<b>9. TEŞEKKÜR</b> .....	<b>130</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>131</b>

## TÜRKÇE ÖZET

Kalp yetmezliğinde plateletlerin aşırı artmış aktivasyonuna bağlı komplikasyonlar oluşabilmektedir. Hemostazis ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine veteriner hekimlik alanında moleküler düzeyde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla bu çalışmada doğal koşullarda kalp yetmezliği gelişen köpeklerde hemostazis (koagülasyon) değişimlerinin platelet proteomik profili ile detaylandırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada materyal olarak farklı ırk, yaş ve cinsiyetten toplam 20 köpek kullanılmıştır. Çalışmada kontrol grubu (n=10) ve test grubu (n=10) olarak iki grup oluşturulmuştur. Klinik, laboratuvar ve kardiyolojik muayene sonuçlarına göre sağlıklı olan köpekler kontrol grubuna, kronik kalp yetmezliği tanımlanan köpekler de test (hasta) grubuna dahil edilmiştir. Her bir köpekten platelet izolasyonu yapılmış ve pelletler analizlere kadar -80 derecede muhafaza edilmiştir. Platelet proteomları UPLC-ESI/QTOF/MS analizi ile belirlenmiştir.

Platelet proteomları *Canis lupus familiaris*'e göre tanımlanmıştır (n=107). Kontrole göre en az  $P < 0,05$  düzeyinde ve 1,2 kattan fazla değişim gösteren proteomlar (n=10) anlamlı kabul edilmişlerdir. Kontrole göre test grubunda guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11, apolipoprotein C-III, apolipoprotein A- II ve clusterin düzeylerinin arttığı; C-X-C motif chemokine 10, cytochrome C oxidase subunit 2, cathepsin D, serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit, creatine kinase B-type ve myotrophin düzeylerinin ise azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak anlamlı değişim gösteren her bir platelet proteinin kalp yetmezliği sürecinde potansiyel biyobelirteç olabileceği ve bu nedenle bu proteinlerin saha çalışmaları ile validasyona ihtiyaç duyduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Köpek, kalp yetmezliği, hemostazis, platelet proteomiği



## İNGİLİZCE ÖZET

### **A new approach to the evaluation of hemostasis in dogs with heart failure: Platelet proteomic profile**

Heart failure can cause haemostatic complications due to platelet over-activation. There is not enough information on the molecular relationship between hemostasis and cardiovascular diseases in veterinary medicine. Thus, in this study, it was aimed to elaborate hemostasis (coagulation) changes with the platelet proteomic profile in dogs with naturally occurred heart failure.

The material of this study consisted of totally 20 dogs with different breed, age, and sexes. Two different group were designed; control (n=10) and test groups (n=10). Based on the physical, laboratory and cardiologic examination results, dogs were included into control (healthy) group, or dogs with heart failure were enrolled into test group. Platelet isolations were performed from each dog, and platelet pellets were stored -80 C until analysed. Platelet proteomes were identified by use of UPLC-ESI/QTOF/MS method.

Platelet proteomes were matched with the previously described proteins for *Canis lupus familiaris*, and compared to the control, at least  $P < 0.05$  level and 1.2 fold change of proteomes was considered statistically significant. Compared to control group, guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11, apolipoprotein C-III, apolipoprotein A-II and clusterin levels increased whereas CXC-motif chemokine-10, cytochrome-C-oxidase subunit-2, cathepsin-D, serine/threonine- protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit, creatine kinase B-type and myotrophin levels decreased in test group.

As a result, each platelet protein identified in the present study could be a potential biomarker in the process of heart failure and therefore these proteins need validation with field studies.

**Key Words:** Dogs, heart failure, hemostasis, platelet proteomic

## 1. GİRİŞ

Bu çalışmada doğal koşullarda kalp yetmezliği gelişen köpeklerde hemostazis (koagülasyon) değişimlerinin platelet (trombosit) proteomik profili ile detaylandırılması amaçlanmıştır. Öncelikli hedef kalp yetmezliğinin tanı ve patofizyolojinin detaylandırılmasına olanak sağlayacak yeni proteinlerin tespiti (identifikasyon) ve sonrasında saha koşullarına uygunluğu için yapılacak çalışmalara (validasyon) altyapı oluşturulmasıdır. Çalışmanın özgün değerine bakılacak olursa; Aralık 2018 itibari ile Pubmed'de "platelet proteomic" tarandığında 955 makaleye, "platelet proteomic AND dogs" tarandığında sadece 5 makaleye, "platelet proteomic AND dogs AND heart failure" tarandığında ise hiç bir bilgiye ulaşılamaması tercih edilen konunun güncel ve orijinal yönüne katkı yapmaktadır.

Plateletlerin koagülasyon sistemi dışında birçok fizyopatolojik olayda ve kardiyovasküler hastalıkların oluşum ve ilerleyişinde önemli rolleri belirtilmektedir. Platelet proteom sayısının 5000 den fazla olduğu düşünüldüğünde bu hücrelerin hastalık ve sağlık durumunda üstlendiği görevlerin boyut ve çeşitliliğinin görünenden daha fazla olduğu söylenebilir. Dolayısıyla bu çalışma, köpeklerde kalp hastalıklarında oluşum ve progresyon açısından önemli bilgiler ortaya çıkarmakla birlikte, hemostazis değerlendirilmesine yeni bir bakış açısı kazandırabilecek potansiyeldedir.

Köpeklerde, insanlarda olduğu gibi, dilate kardiyomiyopati (DCM) ve kronik kalp kapak hastalıkları (CVHD) öncelikli kalp yetmezliği nedenleridir. Kalp yetmezlikleri, hemostazisin bozulmasına yol açabilmekte ve plateletlerin aşırı aktivasyonuna bağlı olarak da trombüsler oluşabilmektedir. Son yıllarda hekimliğimizde koagülasyon sürecinin değerlendirilmesinde tromboelastografiden (TEG) de yararlanılmaktadır. İnsan ve veteriner hekimliğinde Parsiyel tromboplastin zamanı (PT) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) ölçümleri gibi geleneksel yöntemler ve TEG ile yapılan çalışmalara rağmen

koagülasyon sisteminin aktivasyonunu ortaya koyan moleküler düzeyde detay çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu gereksinim koagülasyonda primer rol oynayan plateletlerin aktive olmasıyla morfolojik ve fonksiyonel olarak birçok değişim göstermesi ve bu değişimlerin belirlenen yöntemlerle tam olarak ortaya konamaması etkin olabilir.

Bu aşamada son teknolojik gelişmelerle hem serumda hem de hücrel (platelet) bazda protein tanımlamalarının yapılabilmesi (proteomik); hastalık - sağlık sorunlarının belirlenmesinde yeni detaylar elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Plateletlerin nükleuslarının olmaması sınırlı protein üretimi anlamına gelmektedir. Modern platelet proteomik çalışmaları; binlerce proteindeki kantitatif değişimleri, proteinlerdeki post-transisyonel değişimleri, protein-protein etkileşimlerini ve çok az miktarlarda olmasına rağmen protein lokalizasyonlarını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla platelet proteomik çalışmaları platelet hemostazisini etkileyen organizmadaki temel biyolojik davranışların karakterize edilmesi ve detaylandırılmasına olanak sağlarken, hastalık ve sağlık durumlarında plateletlerin rollerini belirlemeye de imkan sağlamaktadır.

Çalışma sonuçları; yeni hücrel (platelet) proteinlerin ortaya çıkarılmasına, kalp yetmezliği patofizyolojisinin detaylandırılmasına ve muhtemel kardiyak biyobelirteçlerin belirlenmesine imkan sağlayacaktır. Hemostazis değişimleri ile ilgili detayların ortaya konması insan ve hayvanlarda kalp yetmezliği tedavi ve profilaksisi için yeni tanısal ve profilaktik yaklaşımların geliştirmesine olanak sağlayabilecektir. İleride bu proteinlerin tespitini sağlayan test kitlerinin geliştirilmesine de altyapı oluşturulacaktır. Hızlı ve doğru tanı sağlayan protein tespitleri aynı zamanda tedaviye geçiş sürecini kısaltacak, bu durum hasta yaşam süresi ve kalitesine (prognoz) olumlu yansıyacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu çalışma, kalp yetmezliği tanımlanan köpeklerin platelet izolatlarında hücrel proteinlerin belirlenmesi ve plateletlerin pıhtılaşmada (hemostazis) önemli görevleri olması nedeniyle hemostazis ve platelet proteinleri arasında ilginin ortaya çıkarılmasına yöneliktir. Bu nedenle genel bilgiler bölümünde çalışma amacına uygun olarak kalp yetmezliği, hemostazis ve proteomik konularına yer verilmiştir.

### 2.1. Kalp Yetmezliği

**2.1.1. Tanım:** Kalp yetmezliği; kalbin kan pompalama kabiliyetindeki yetmezlik sonucu doku hipoperfüzyonu ve sonrasında kanın periferel ve sentral dokularda birikimi (venöz konjesyon) ile karakterize morfolojik ve fonksiyonel kalp hastalığıdır (Fuster ve ark., 2002; Wendy, 2011). Kalp yetmezliğinin vücutta yüksek venöz basınca bağlı olarak ödem oluşturması “konjestif kalp yetmezliği” olarak tanımlanmaktadır (Reece, 2003b).

**2.1.2. Etiyoloji:** Kalp yetmezliği insan ve veteriner hekimliğinde önemli sağlık sorunlarından biridir. Köpeklerde ve insanlarda kalp yetmezliği öncelikli olarak idiyomatik dilate kardiyomyopati (dilated cardiomyopathy - DCM) ve kronik kalp kapak hastalıklarına (chronic valvular heart disease - CVHD) bağlı gelişmektedir. DCM ve CVHD her yaş, cinsiyet ve ağırlıktaki köpeklerde görünse de; Danua ve Doberman gibi büyük ırk köpeklerin DCM'ye (Martin ve ark., 2010), küçük ve orta büyüklükteki köpeklerin de (Pomeranian, Terrier, Cavalier king charles spaniel vb.) CVHD'e daha duyarlı oldukları bilinmektedir (Wendy, 2011). Hastalıkların etiyojilerinde öncelikli olarak insanlarda olduğu gibi genetik faktörler rol oynamaktadır (Simpson ve ark., 2015). Bu yönüyle köpeklerdeki DCM olguları insanlardaki DCM olguları için bir model olarak düşünülmektedir. Bu genetik ve etiyojistik benzerlik her iki canlı türünde yapılan çalışma sonuçlarının birbirlerine adapte edilebileceğini de göstermektedir (tek sağlık konsepti) (Tarnow, 2007).

Kalp yetmezliğinin belirli bir hastalık veya tanı olmadığı, bir sendrom olarak düşünülmesi gerektiği ifade edilmektedir. Kalp yetmezliğinin dört ana mekanizma sonucu meydana geldiği bilinmektedir. Bunların; miyokardiyal fonksiyon bozukluğu (sistolik yetmezlik), sistolik mekanik hacim ve basınç artışı, ventriküler dolum yetersizliği (diyastolik yetmezlik) ve hiperkinetik sirkülasyona yol açan nedenler olduğu tespit edilmiştir (Kittleson, 2018).

**2.1.3. Kalp Yetmezliği Tipleri:** Kalp yetmezliği anatomik yapı ve fizyolojik görevlere göre farklı sınıflandırılmaktadır. Ventrikül lokalizasyonuna göre; sağ kalp yetmezliği, sol kalp yetmezliği veya çift taraflı (biventriküler) yetmezlik, patofizyolojik olarak da; sistolik disfonksiyon ve diyastolik disfonksiyon olarak sınıflandırılmaktadır (Buchanan, 1999; Wendy, 2011).

Normalde akciğerlerden sol atriyuma (LA) gelen oksijenden zengin kan önce sol ventriküle (LV), oradan da aorta (Ao) aracılığı ile vücudun tamamına ileilmektedir. Miyokardiyal yetmezlik olduğunda; LV kasılması bozulacağından kan sistemik dolaşıma yeteri kadar gönderilememektedir. Bu nedenle sol kalp yetmezliği “sistolik kalp yetmezliği”, “ileri atım yetmezliği” ya da “forward failure” olarak da tanımlanmaktadır. Sol kalp yetmezliğinin öncelikli nedeninin DCM olduğu tespit edilmiştir. Bu yetmezlikte yaygın komplikasyonların hipoperfüzyon, periferel nabız kalitesinde azalma ve kardiyo-renal sendrom olduğu bilinmektedir (Wendy, 2011). Sağ kalp yetmezliği; sağ ventrikül dolum basıncının yetersiz olması nedeni ile “diyastolik yetmezlik”, “geri dönüşüm yetmezliği” ya da backward failure” olarak da adlandırılmaktadır (Boon, 2011). Kalbin sağ ventrikülü akciğerlere yeterli miktarda kan pompalayamazken, perifer dokulardan venöz kanın sağ atriyuma toplanmasında da yetersizlikler şekillenmektedir. Venöz damarların dolgunluğu (pasif konjesyon) hidrostatik basınç artışına ve kanın sıvı kısmının doku boşlukları ve ekstrasvasküler alana çıkmasına (ödem) yol açmaktadır. Konjesyon kronik bir süreçte meydana geldiğinden konjestif kalp yetmezliğine kronik kalp yetmezliği de denilmektedir (Abbot, 2016; Buchanan, 1999). Biventriküler kalp yetmezliği; kalbin her iki tarafının yetmezliği ile ilgili olup, ilgili anatomik taraflara özgü patofizyolojik değişimler ve klinik yansımaların birlikte görülmesi söz konusudur (Wendy, 2011).

**2.1.4. Kalp Yetmezliği Patofizyolojisi:** Sistolik kalp yetmezliği; ventriküler genişleme (LV remodeling) ile birlikte fraksiyonel kasılma (FS) ve ejeksiyon fraksiyonunda (EF) azalma ile karakterizedir (Wendy, 2011). LV'de diyastol ve sistol sonunda hacim ve basınç artışı olması; kalp debisinin düşmesine ve sistemik dolaşımın bozulmasına yol açmaktadır. Bu yetmezlikte LV duvar kalınlığı genel olarak değişmeden kalmakta; ancak, kasılma gücünde kayıp ve LV duvar stresinde (afterload) artış şekillenmektedir (Smith ve ark., 2016). Bu sendromda sistemik dolaşım yetmezliği ve kanın pulmoner venlerde kalması; fiziksel aktivite sırasında taşıpnö, solunum güçlüğü veya öksürüğe neden olup egzersiz intoleransına yol açmaktadır (Chatterjee ve Rame, 2008).

Diyastolik kalp yetmezliği; genelde sistolik fonksiyonlar normal iken LV hipertrofisi ve sertliğine bağlı olarak diyastol sırasında kalp boşluklarına yeterli volümde kan dolamaması ve kardiyak debinin azalması ile karakterize bir sendromdur (Smith ve ark., 2016). LV sert olduğunda erken diyastolde yavaşça gevşerken, geç diyastole daha fazla direnç göstermekte; böylece diyastolik basınç yükselmektedir. Düşük kardiyak debi egzersiz intoleransı olarak kendini gösterirken, yüksek diyastolik basınç pulmoner venlerden pulmoner kılcal damarlara doğru basıncı ileterek efor dispnesi ile kendini belli etmektedir. Bu patofizyolojik anormallikler sistolik kalp yetmezliğinde olduğu gibi nörohormonal aktivasyonu tetiklemektedir (Aziz ve ark., 2013; Martin ve Corcoran, 1997).

**2.1.5. Kardiyak Kompensatuvar Mekanizmalar:** Kalp yetmezliği; kalp, iskelet kası ve böbrek fonksiyonlarının bozulduğu, sempatik sinir sistemi (SSS) ve nörohormonal mekanizmaların uyarıldığı kompleks multi-sistemik bir bozukluktur (Wendy, 2011). Kalp yetmezliğinde kalp debisi düştüğünde kan basıncını korumak için kompanzetuar mekanizmalar (renal, kardiyovasküler ve nörohümorale yanıtlar) devreye girmektedir (Martin ve Corcoran, 1997; Reece, 2003b). Başlangıçta bu kompanzetuar mekanizmalar yararlı etkiler ile patolojik duruma adaptasyon sağlasalar da, sonrasında pek çok klinik belirtinin oluşması ya da şiddetlenmesine yol açmaktadırlar (Kemp ve Conte, 2012).

Ventrikülerde morfolojik ve fonksiyonel değişimlerin oluşmasında; kardiyak hücre kaybı, aşırı interstisyel matriks formasyonu ve miyositlerde kollajen

deformasyonu rol oynamaktadır. Miyokardiyal kollajenazlar ve matriks metalloproteinazlar ventriküllerin dilatasyon ve distorsiyonuna yol açarak komşu miyositlerin kaymasına sebep olmaktadır. Bu değişimler kalpteki odacık boyutlarını, duvar stresini ve miyokardiyal oksijen ihtiyacını arttırmaktadır. Kalpte bu patolojik değişimlerin oluşumunda; mekanik kuvvetlerin (yüksek basınca bağlı artan duvar gerilmesi), çeşitli nörohormonların (anjiyotensin-II, norepinefrin, aldosteron ve endotelin) ve pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF ve interlökinler) rol oynadığı belirlenmiştir. Oksidatif fosforilasyon, yüksek enerjili fosfat metabolizması,  $Ca^{++}$  iyon değişimleri, kasılma proteinleri (troponinler), protein sentezi ve katekolamin metabolizması kalp yetmezliğinde etkili diğer unsurlardır (Martin ve Corcoran, 1997; Reece, 2003b; Wendy, 2011).

Nörohormonal aktivasyon arteriyel basıncın korunmasında ve kalp yetmezliğinin erken dönemlerinde kompenzasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Kemp ve Conte, 2012). SSS kalp yetersizliğinde baroreseptörler aracılığıyla inotropik destek sağlayarak kardiyak çıkışı koruyan erken bir kompenzatuvar mekanizma olarak kabul edilmektedir (Martin ve Corcoran, 1997). Bununla birlikte sempatik aktivasyon süreklilik gösterdiğinde zararlı etkileri (aritmi, taşikardi ve miyokardiyal toksisite) ortaya çıkmaktadır (Wendy, 2011). Kronik sempatik stimülasyon; renin anjiyotensin aldesteron sistem (RAAS) ve diğer nörohormonları da harekete geçirerek venöz (preload) ve arteriyel tonu (afterload) artırmakta; böylece sodyum (Na) ve suyun progresif tutulumu ödem oluşumu ile sonlanmaktadır (Kemp ve Conte, 2012).

Sempatik yanıtı takiben daha uzun süreçte devreye giren koruyucu bir mekanizma da RAAS aktivasyonudur. RAAS uyarılması plazma renin, anjiyotensin II ve aldosteron konsantrasyonlarında artışa yol açmaktadır (Kemp ve Conte, 2012). Anjiyotensin II fizyolojik olarak böbrek ve sistemik sirkülasyonda güçlü bir vazokonstriktör iken, noradrenalinin ve aldosteron salınımlarını stimüle edip vagal tonu inhibe etmektedir. Bu hormonal değişim, dolaşımda Na ve suyun tutulmasına ancak potasyum (K) atılımına yol açmaktadır. Anjiyotensin II'nin kardiyak miyositler üzerine etkileri ile kronik kalp yetmezliğinde endotelial disfonksiyona yol açtığı bilinmektedir (Wendy, 2011).

Natriüretik peptitlerin kalp, böbrekler ve SSS üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Kim ve Januzzi, 2011). Natriüretik peptitler kalpteki yeniden şekillenmeye yanıt olarak natriürezis ve vazodilatasyon oluşturmak adına atriyum (ANP) ve ventriküllerden (BNP) salgılanmaktadır. Dolaşımdaki ANP ve BNP düzeyleri kalbin artan volüm (volume overload) ve basınç yüküne (pressure overload) yanıt olarak artarken, anjiyotensin-II'nin vasküler ton, aldosteron sekresyonu ve renal Na reabsorpsiyonu üzerindeki etkilerine fizyolojik antagonistler olarak da davranmaktadırlar (Kemp ve Conte 2012; Wendy, 2011).

Vazopressin böbrek üstü bezinden salgılanırken anjiyotensin-II oluşumunu da kolaylaştırmaktadır. Kalp yetmezlikli hastalarda arteriyel basınç düşmesi baroreseptörler tarafından algılanınca vazopressin salgılanması uyarılmaktadır (Kemp ve Conte, 2012). Bu değişimle birlikte şiddetli kronik kalp yetersizliğinde anti-diüretik hormon konsantrasyonları da artış göstermektedir (Wendy, 2011). Endotelin vasküler endotelial hücreler tarafından salgılanan, Na tutulumunu destekleyen ve renal damarları daraltıcı etkileri belirgin olan güçlü bir vazokonstriktör peptid olarak tanımlanmaktadır. Endotelin-1'in plazma seviyesinin prognostik öneme sahip olduğu ve kalp yetmezliğinin semptomatik ve hemodinamik şiddeti ile orantılı olarak arttığı ortaya konmuştur. Endotelin'in vazokonstriktör özellikleri göz önüne alındığında; endotelin aracılı vasküler ve miyokardiyal yeniden şekillenmeyi inhibe eden ve bu nedenle kardiyoprotektif olarak kabul edilen ilaçlar (endotelin reseptör antagonistleri) üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Wendy, 2011). Renal vazokonstriksiyon sürecinde arahidonik asit zinciri de aktive edilerek bazı prostaglandin konsantrasyonlarında (PGE2 ve PGI2) artma şekillenir. Kallikrein-kinin sistem aktivasyonu; bradikinin ve PG üretimini artırıp natriürezis ve vazodilatasyon meydana getirmektedir. Bilinen en önemli sitokin mediatör tümör nekrozis faktör alfa'nın (TNF- $\alpha$ ) kronik kalp yetmezliği olan kaşektik hastalarda dolaşımdaki konsantrasyonlarının arttığı belirlenmiştir. TNF- $\alpha$  ayrıca kronik kalp yetmezliği olan hastalarda endotelial anormalliklerin gelişiminden de sorumlu tutulmaktadır (Jackson ve ark., 2000).

**2.1.6. Kalp Yetmezliğinin Klinik Belirtileri:** Kronik kalp yetmezliğinin klinik bulguları öncelikle kronik nöro-humoral aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Sol



ventriküler preload (önyük) artışı pulmoner venlerde genişlemeye ve pulmoner ödeme (hipoksemi, siyanozis ve auskültasyonda çıtırtı sesi / artmış bronko-veziküler sesler) yol açmaktadır. Bu durum ventriküler preload artışını tetikleyerek; sentral venöz basınç artışı, juguler venöz genişleme, hepatomegali, splenomegali, plevral efüzyon ve asites ile sonuçlanmaktadır (Chatterjee ve Rame, 2008; Wendy, 2011). Sistolik ve diyastolik kalp yetmezliğinin klinik bulgularıyla bu klinik bulgulara ait patofizyolojik mekanizma detayları Tablo-1 ve Tablo-2 de özetlenmiştir.

**Tablo-1:** Sistolik (sol) kalp yetmezliği ile ilgili klinik bulgular ve patofizyolojik mekanizmaları (Martin ve Corcoran, 1997)

Klinik Bulgu	Patofizyolojik mekanizma
Egzersiz intoleransı	Kas perfüzyonunun zayıflaması
Solgun mukoz membranlar ve ekstremiteelerde soğukluk	Periferel vazokonstriksiyon (sempatik ve anjiyotensin aktivitesi)
Taşikardi	Sempatik aktivasyon
Femoral nabızda zayıflama	Sol ventrikül kontraktilesi ve stroke volümde azalma
BUN ve Cr'de artma, oliguri	Renal hipoperfüzyon
Sus içme isteği	Anjiyotensin II stimulasyonu
BUN: Kan üre nitrojen	Cr: Kreatinin

**Tablo-2:** Diyastolik (sağ) kalp yetmezliği klinik bulguları ve patofizyolojik mekanizmaları (Martin ve Corcoran, 1997)

Klinik Bulgu	Patofizyolojik mekanizma
Dispne – taşipne Öksürük	Pulmoner ödem – plevral efüzyon Öksürük reseptörlerinin stimulasyonu: 1- LAE, RAE veya generalize kardiyomegali nedeni ile ana bronşlara bası yapılması; 2- Alveolar ödem
Jugular dilatasyon, hepatomegali	Sağ kalp yetmezliği (perikardial tamponat, DCM vb.) ve ascites
Akciğer oskültasyonu – çıtırtı ve harharalar, siyanoz	Alveolar ödem
Kardiyomegali	Volüm yüklemesi – sıvı retensiyonu

LAE: Sol atriyal büyüme

RAE: Sağ atriyal büyüme

DCM: Dilate kardiyomiyopati

**2.1.7. Kalp Yetmezliğinin Tanısı ve Sınıflandırması:** Kalp hastalıklarının tanısında kullanılan tüm detaylar kalp yetmezliğinin ortaya konması için gereklidir. Klinik bulgular ve diyagnostik sistemlerden elde edilen bilgiler tanıya götürür. İnsanlardan modifiye edilen şekli ile hayvanlarda kalp yetmezliği sınıflandırılmıştır

(Martin ve Corcoran, 1997). Bu amaçla insanlarda New York Heart Association (NYHA) sınıflandırma sistemi kullanılmış; ancak sonrasında Amerikan Kalp Birliğine bağlı sınıflandırma öncelik kazanmıştır. ACVIM (American College of Veterinary Internal Medicine); hastaları daha objektif olarak sınıflandırmak ve kalp yetmezliği grup ve alt grubunu bulguların da şiddetine göre uygun tedavilerle buluşturmak adına yeni bir sistem oluşturmuştur (Tablo- 3). Bu sınıflandırmada (kategori A, B, C ve D); hastaların bir aşamadan diğerine geçmesi ve konjestif semptomların ilaçlarla kontrol altına alınsa dahi, daha erken bir aşamaya (bir önceki safhaya) geri dönemeyeceği ilkesi ağır basmaktadır (Abbot, 2016).

**Tablo-3:** ACVIM klasifikasyonuna göre kalp yetmezliğinin grup ve alt gruplarına ayrılması, tedavi seçeneklerinin sunulması (Smith ve ark., 2016)

Grup	Tanımlama kriteri	Tedavi
Kategori A Asemptomatik	Sağlıklı predispoze ırklar	Tedavi yok. Yılda bir kontrol
Kategori B Asemptomatik	Kalp üfürümü olan, semptomu olmayan ancak kardiyomegalisi olmayan (B1) ve olan (B2) olgular	Diyet değişimi önerilmiyor, varsa hipertansiyon mücadelesi. B1: optimal bir tedavi söz konusu değil; B2: ACE-I ve/veya pimobendan
Kategori C Semptomatik	Geçmişte veya halen kalp yetmezliği bulguları ile birlikte yapısal kardiyak anormallite mevcuttur, evde tedavi alabilecek hastalar	Standart tedavi: pimobendan, furosemid ve ACE-i. Uzun süreli tedavide spirololakton. Atriyal fibrilasyon (AF) varsa digoksin; ventriküler aritmi varsa lidokain; diyet değişimi; egzersiz sınırlamasına gerek yok
Kategori D Semptomatik	Konjestif kalp yetmezliği semptomları gösteren ve hastanede tedavi alabilecek refraktör hastalar	Standart tedavi; AF varsa digoksin ve/veya diltiazem; ventriküler aritmi varsa lidokain; diyet değişimi (Na sınırlı) + kalori ve protein desteği; egzersiz sınırlaması

Kalp hastalıklarının tanısında klinik muayene ile başlatılan sürecin görüntülü tanı teknikleri (toraks radyografileri), kardiyolojik muayeneler (EKG ve ekokardiyografi) ve laboratuvar analizleri ile (tam kan sayımı, biyokimyasal profil ve kardiyak biyobelirteçler vb.) detaylandırılması gerekmektedir (Wendy, 2011).

Bazı ırkların spesifik kalp hastalıklarına genetik olarak predispoze olduğu unutulmamalıdır. Bu bağlamda Cavalier king charles spaniel'lerde mitral kapak hastalıkları, Dobermanlarda da DCM sık görülmektedir (Kittleson, 2018a). Çabuk yorulma, öksürük, dilde ve mukozlarda morarma, solgunlaşma ve halsizlik gibi klinik şikayetleri olan olguların büyük bir kısmında kalp ile ilgili hastalıklar tespit edilmektedir. Böyle hastaların fiziksel muayenesinde toraksın oskültasyon bulguları (üfürüm, gallop ritim, aritmi, bradikardi ve taşikardi) kalp hastalığı şüphesini

güçlendirmektedir. Abdominal genişleme (asites), jugular ven dolgunluğu ve hepatomegali sağ kalp yetmezliğinin klinik yansımaları olarak düşünülmektedir. Toraks radyolojisinde lateral ve dorsoventral pozisyonlardaki bulgular kalp hastalığına eşlik eden plevral ve/veya pulmoner sıvı varlığını ortaya koymaktadır (Martin ve Corcoran, 1997; Wendy, 2011). Schober ve ark. (2010) radyolojik bulgular temelinde kalpte büyüme (kardiyomegali), pulmoner damarlarda dolgunluk ve akciğerde ödem varlığına göre skorlandırma ile kalp yetmezliği tanımlaması (skor >4) yapılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

EKG ile klinik muayenede belirlenen ritim anormalitelerinin (taşikardi gibi) teyit edilmesi ve detaylandırılması (atriyal/ventriküler taşikardi ve atrial/ventriküler fibrilasyon gibi) mümkün olmakta; tanı ve tedavi aşamasında ilaç seçimlerine (anti-aritmikler) katkı sağlanmaktadır (Smith ve ark., 2016). Tanıda en önemli unsurun kalp ultrasonu yani ekokardiyografi olduğu bilinmektedir (Boon, 2011). Günün teknolojisine uygun olarak manyetik rezonans ve bilgisayarlı tomografi seçenekleri de gerektiğinde kalp hastalıklarının tanısında kullanılmaktadır (Smith ve ark., 2016).

İnsanlarda olduğu gibi köpeklerde de kalp yetmezliği öncelikli olarak DCM ve kronik kapak hastalıklarına bağlı gelişmektedir (Wendy, 2011). DCM tanısı için EKG ve ekokardiyografik bulgular temelinde skorlandırma sistemi kullanılmaktadır. Toplam skor 6 veya daha fazla ise DCM ile uyumlu, skor <6 ise sık aralıklarla gözlenmesi önerilmektedir (Wendy, 2011).

Miksomatöz mitral kapak hastalıkları (MMVD) için Amerikan Kardiyoloji Birliği'nin önerisi doğrultusunda klinik (üfürüm, torasik radyolojik değişimler) ve ekokardiyografik bulgular temelinde tanımlama yapılmaktadır (Gordon ve ark., 2017). Kalp yetmezliği sınıflandırılmasında olduğu gibi A grubu; kalp hastalığına predispoze olan ve oskültasyonda üfürüm alınmayan olguları, B grubu; kalp hastalığı ve üfürümü olan ancak klinik bulgu göstermeyen olguları, C ve D grupları da mitral kapak hastalığı ve buna bağlı gelişen kalp yetmezliği bulgularını gösteren olguları kapsamaktadır (Gordon ve ark., 2017). MMVD tanımlaması; mitral kapakta kalınlaşma (endokardiozis), prolapsus (MVP), ruptur ve vejetatif üremeleri kapsamaktadır (Smith ve ark., 2016; Wendy, 2011). MMVD'nin tanımlamasında ekokardiyografik değerlendirmeler altın standart olarak kabul edilmekte; özellikle iki

boyutlu, renkli ve spektral Doppler ölçümleri ile diyagnostik detaylar elde edilebilmektedir (Smith ve ark., 2015).

Rutin klinik laboratuvar test sonuçları genellikle non-spesifiktir. Düşük kardiyak debiye bağlı prerenal azotemia, sistemik konjesyona bağlı karaciğer enzimlerinde artış veya eş zamanlı kardiyak olmayan hastalık varlığına bağlı bulgular tespit edilebilmektedir (Smith ve ark., 2016). DCM'li olgularda prerenal azotemi ile birlikte hafif elektrolit anormallikleri ve anemi görülme olasılığının yüksek olduğu belirtilmektedir (Wendy, 2011). Kalp yetmezliğinde kardiyak hasar belirteçleri olarak serum CK (özellikle CK-MB), AST, LDH ve miyoglobin düzeyleri yükselim gösterirken, bu parametrelerin aynı zamanda karaciğer veya iskelet kası hasarlarında da artacağı unutulmamalıdır (Martin ve Corcoran, 1997). Günümüzde kardiyak hasarlar daha spesifik biyokimyasal belirteçlerle ortaya koyulmakta; tanı ve prognoz tayininde avantajlar sağlanmaktadır. Kardiyak troponin I (cTnI) miyokardiyal hücre hasarının spesifik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kardiyak membran hasarı ve hücre nekrozu cTn'lerin dolaşımında yükselmesine yol açmaktadır. CTnI düzeyindeki artma kalp hasarının sürecine (akut-kronik) ve miyokardiyal hasarın derecesine bağlı değişim göstermektedir. Miyosit hasarından sonra serum cTnI düzeyi 4 saat içinde artıp 12-24 saatte pik yaparak 1-3 hafta içinde fizyolojik sınırlara geri dönmektedir. Serum cTnI düzeyi miyokardiyal hasarlanma ile ilgili olarak (miyokardial inflamasyon, travma, konjestif kalp yetmezliği ve hipertrofik kardiyomiyopati) artabileceği gibi, non-kardiyak nedenlere bağlı olarak da (gastrik dilatasyon / volvulus, renal hastalıklar, azotemi vb.) yükselebilmektedir (Smith ve ark., 2016; Wendy,2011).

Tanısal aşamada öncelik alan bir diğer kardiyak biyobelirteçler natriüretik peptid BNP (NT-ProBNP) ve daha az önemde de NT-ProANP'dir (Nelson ve Couto, 2014). Natriüretik peptidler hastalarda konjestif kalp yetmezliğinin varlığı ve prognozunu oraya koymakta başarılı olarak görülmekle birlikte, kalbin morfolojik değişimden daha çok fonksiyonel biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadırlar. Serum cTnI ve NT-proBNP düzeyleri insan, kedi ve köpeklerde solunum sistemi şikayetlerinin altyapısında kardiyak hastalıkların varlığını ortaya koymak için hekimlere avantaj sağlamaktadırlar (Smith ve ark., 2016; Wendy, 2011).

**2.1.8. Kalp Yetmezliği Tedavisi:** Sunulan bu çalışmanın kapsamında kalp yetmezliği tedavisi ve etkinliğinin izlenmesi söz konusu değildir. Bu nedenle bu bölümde konu btnliğiğinin sağlanması adına sadece temel tedavi seçenekleri verilecektir. Tablo-3’de kalp yetmezliğinin sınıflandırılmasına göre önerilen tedavi planları da özetlenmiştir. Buna göre kalp yetmezliğinde temel tedavi yaklaşımları dört ana başlık altında toplanmaktadır (Boswood ve ark., 2016; Duker-Mcewan ve ark., 2003; Oyama ve ark., 2011; Peddle ve ark., 2012; Vollmar ve Fox, 2016):

A- Kalbin iç gücünü azaltmak: Kalbin yükünü (nyk ve ardyük) azaltan ilaçlar kullanılmaktadır. Diüretikler (furosemid, tiyazid vb.), anjiyotensin dönüşüm enzim inhibitörleri – ACEi (enalapril, benzapril) ve miks vazodilatörlerin (pimobendan) nerilen doz ve sıklıkta kullanımları tavsiye edilmektedir.

B- ödemi azaltmak: Plevral, peritoneal efüzyon ve pulmoner demin giderilmesi ve dolayısıyla solunum performansı ve hareket kabiliyetinin artırılması için başta furosemid (2-4 mg/kg, İV-PO, 2x1) olmak üzere diüretiklerin kullanılması, gerektiğinde de özellikle D sınıfı kalp yetmezliklerinde diğer diüretiklerle (tiyazid ve spironolakton) kombine edilmesi önerilmektedir.

C- Kontraktiliteyi artırmak: Pozitif inotropların kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla hem vazodilatör hem de inotrop olan ve bu nedenle “inodilatr” olarak tanımlanan pimobendan (0,25–0,5 mg/kg/gün, PO) kullanılması tavsiye edilmektedir. Digoksin zayıf pozitif inotropik etki nedeni ile tercih edilmemektedir.

D- Aritmi (varsa) düzeltmek: Supraventriküler taşikardisi olan olgularda (atriyal fibrilasyon vb.) digoksin (0,005 – 0,008 mg/kg, 2x1, PO) tek başına ya da diltiazem gibi (1 mg/kg, 3x1, PO) bir kalsiyum kanal blokörü ile kombine edilerek kullanılmaktadır.

Tedavi aşamasında dikkat edilmesi gereken noktalardan birisi de kalp hastalıklarının önemli komplikasyonlarından biri olan arteriyal tromboembolizm (ATE)’dir. Bu tür hemostazis bozukluklarının kalp hastalıklarının seyri ile köpeklerde yaygın olmadığı ifade edilmektedir. Bu bilgiye paralel olarak Winter ve ark. (2012)’de ATE tanımladıkları 26 köpeğin hiç birinde kalp hastalığı bildirmemişlerdir. Diğer taraftan Lake-Bakaar ve ark. (2012) aortik trombozis tanımladıkları 31 köpeğin altısında kardiyak altyapı tespit etmişlerdir. Bu çelişkili

bilgiler kalp yetmezliğinde hemostazis sürecinin izlenmesi gerektiğini, ihtiyaç olduğunda da insanlarda olduğu gibi anti-platelet ilaçların (klopidogrel, aspirin vb.) kullanılması gerektiğini göstermektedir (Smith ve ark., 2016). Bu hastalıklarda koagülasyon (hemostazis) zincirindeki değişimin belirlenmesi; insan ve hayvanlarda tanı, tedavi ve profilaksi stratejilerinin geliştirilmesinde önem arz etmektedir (Lake-Bakaar ve ark., 2012; Winter ve ark., 2012).

## **2.2. Hemostazis**

**2.2.1. Tanım:** Hemostazis (koagülasyon sistemi); birbiri ile ilgili, birbirinin etkilerini arttıran, karşı mekanizmayı harekete geçiren, vücut savunma mekanizması ile de bağlantıları olan çok yönlü karmaşık bir sistemdir (Atamer, 2007). Basit tanımlama ile vücudun kan kaybını önleyen fizyolojik bir savunma mekanizmasıdır. Hemostazis ayrıca aşırı pıhtı oluşumunu engelleyen ve kanın akışkanlığını yeniden kazandıran sistemleri de (fibrinolizis) içermektedir (Atalan, 2013).

**2.2.2. Hemostazide Rol Oynayan Faktörler:** Hemostaziste rol alan faktörler arasında; damar duvarı, kan akımı, plateletler, koagülasyon faktörleri ve inhibitörleri, fibrinolizis faktörleri ve inhibitörleri, akut faz proteinleri, fosfolipidler, prostoglandinler ve sitokinler sayılmaktadır. Bu faktörlerin vücutta sürekli ve düşük hızda belirli bir oranda salınımı söz konusu iken, aralarındaki dengenin korunması için sürekli bir etkileşim olması da kaçınılmazdır (Atalan, 2013; Atamer, 2007).

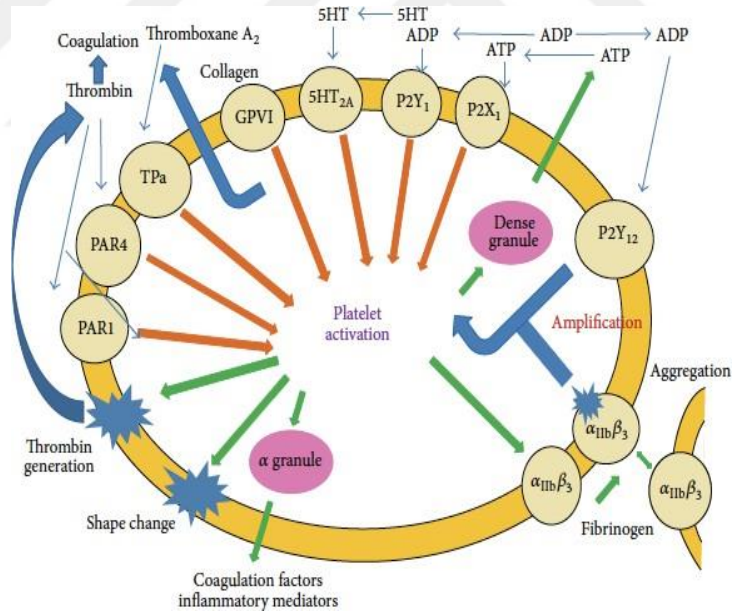
**2.2.3. Hemostazis Basamakları:** Üç ana basamaktan oluşmaktadır.

Primer hemostazis: Vasküler endotelyum, plateletler ve von Willebrand faktörün (vWf) aktivasyon ve etkileşimini kapsamaktadır. Damar endotelyumundan dolaşıma vazoaktif aminler (NO, PGI, fibronektin, serotonin) salınır. Vazodilatasyon ve platelet adezyonunda azalma ile anti-trombotik etki oluşurken, kan dolaşımında pıhtılaşmanın da önüne geçilmiş olunur. Endotelyal hasarlanmayı takiben damar subentodelyumunda bulunan kollojen ile platelet etkileşmesi; platelet adezyon, aktivasyon ve agregasyonuna yol açarak primer (geçici) hemostatik plak oluşturulur (Atalan, 2013; Reece, 2003a; Tutar ve ark., 2000; Willard ve Tvedten, 2012).

Plateletler megakaryositlerin sitoplazmasından oluşan küçük parçacıklardır. Çapları 2-4 Pm, hacimleri 5-8 fL arasında, bikonveks ve çekirdeksiz hücrelerdir

(Atamer, 2007). Dolaşımdaki platelet sayısı köpek ve kedilerde 180.000 – 750.000/ $\mu$ L düzeyde olup, bazı ırklar (Cavalier king charles spaniel) genetik olarak trombositopeniktir (Willard ve Tvedten, 2012). Plateletler dolaşımda 8 - 11 gün canlı ve aktif kalırken, yarı ömürleri ortalama 2-3 gündür (Reece, 2003a).

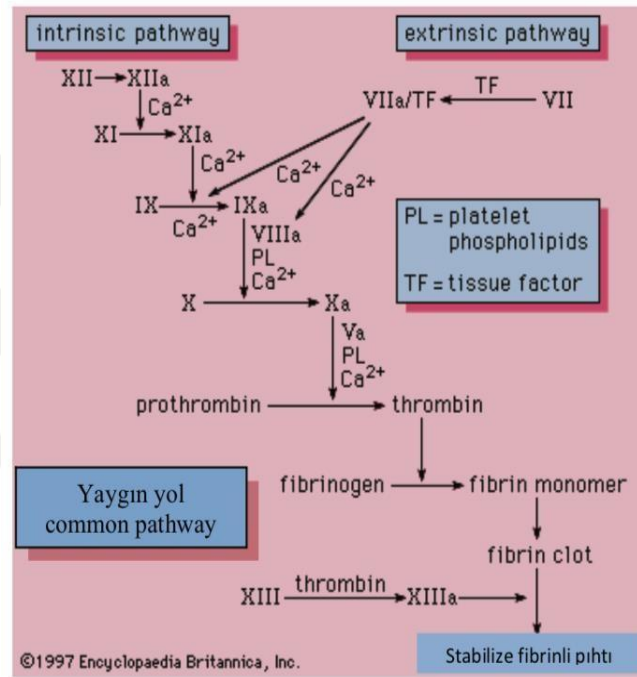
Plateletler perifer dolaşımda olgunlaştıkça endositoz yoluyla fibrinojen gibi plazma proteinlerini, vWf, FV ve albümini hücre içine alarak alfa granül adı verilen organellerinde depo etmektedirler. Plateletlerin alfa granülleri aynı zamanda beta-tromboglobulin ve trombospondin gibi hücre adezyonu ve migrasyonundan sorumlu plateletlere özgü proteinleri de içerirler. Bu granül içerikleri trombin, kollajen, adenosin difosfat (ADP) ve platelet aktive edici faktör (PAF) gibi agonistler tarafından plateletlerin aktive edilmeleriyle dolaşıma salınmaktadır (Şekil-1). Plateletlerin iç yapısındaki yoğun tübüler sistem aynı zamanda araşidonik asit ve tromboksan A2 gibi eikozanoidleri de sentezlemektedir (Reece, 2003a).



**Şekil-1:** Platelet aktivasyonu ve sonrasında alfa ve dense granüllerden salınan mediyatörlerle koagülasyon zincirinin aktive olması (Ghoshal ve ark., 2014)

**Sekonder hemostazis:** Primer hemostazis sürecini sekonder hemostazis izlemektedir. Bu süreçte amaç; kalıcı fibrin ipliklerinin ve stabil pıhtının oluşturulmasıdır. Bu amaçla koagülasyon faktörleri (FI – XIII) kullanılmaktadır (Şekil-2). Bunlar plateletlerde granüller içinde depolanırken, platelet aktivasyonu ile

salınır hale gelmektedirler. Dolaşımda olmayan tek koagülasyon faktörünün subendotelyal alanda bulunan doku faktörü (Tissue Factor-TF, Faktör III) olduğu tespit edilmiştir (Ghoshal ve ark., 2014). Koagülasyon faktörleri karaciğerde üretilip plazmaya salınırlar, inaktif olmalarına rağmen koagülasyon sürecinde aktive edilirler. Doku faktörü ekstrinsik sistemin, FXII ise intrinsik sistemin stimülanıdır. Farklı yollardan işleyen her iki sistem daha sonra birlikte yaygın sistemi (Common pathway) aktive ederek; trombinin fibrinojeni fibrine dönüştürmesine ve kalıcı fibrin (pıhtı) oluşumuna olanak sağlarlar (Willard ve Tvedten, 2012).



**Şekil-2:** Sekonder hemostazide intrinsik, ekstrinsik ve yaygın yol üzerinden kalıcı fibrin (pıhtı) oluşumu (www.britannica.com)

Tersiyer hemostazis (fibrinolizis): Hemostatik denge için pıhtının uzaklaştırılması da önemlidir. Kanda prokoagülanlardan daha fazla endojen antikoagülanlar mevcuttur. Koagülasyonu inaktive eden bu endojen antikoagülan maddeler; antitrombin III (ATIII), protein C, protein S ve doku faktörü inhibitörüdür (Atalan, 2013). Kalıcı pıhtının hasarlı bölge ve dolaşımdan uzaklaştırılmasını gerektirmektedir. Plasminojen'in fibrini parçalamasıyla fibrin parçalanma ürünleri (FDP) açığa çıkmakta; d-dimer gibi ürünler de koagülasyon zincirini inhibe etme özelliği göstermektedirler (Gale, 2011; Willard ve Tvedten, 2012).



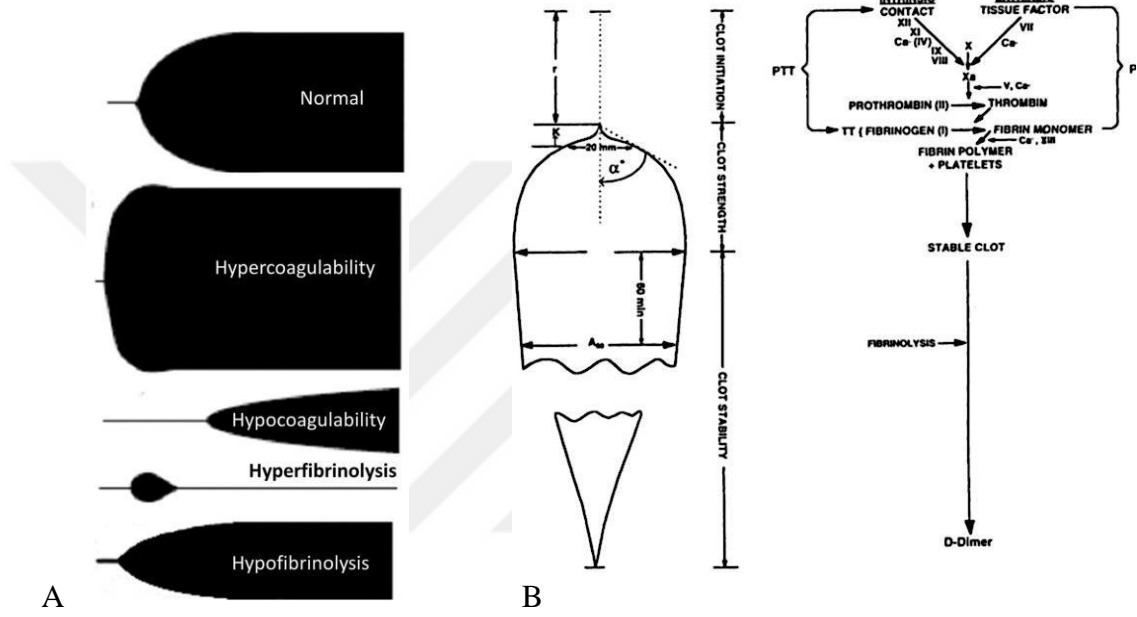
**2.2.4. Hemostazis – Tanısal Yaklaşım:** İnsanlarda olduğu gibi hemostazis kedi ve köpek hekimliğinde global pıhtılaşma sürelerinin (protrombin zamanı – PT ve aktive edilmiş tromboplastin zamanı - aPTT) ölçümleri ile takip edilmekte, fibrinolitik sistem (tersiyer hemostazis) de fibrin parçalanma ürünlerinden D-dimer düzeyleri ile irdelenmektedir (Tablo-4). Trombin zamanı (TT), trombin – antitrombin antikorları (TAT), anti-trombin III (AT-III) ve pıhtılaşma faktörlerinin ölçümleri pratik koşullarda değerlendirilemeyen, dolayısıyla kapsamlı laboratuvar koşullarına gereksinim duyulan detaylardır (Bauer ve ark., 2009). PT ve aPTT sürelerinde hipokoagülasyon durumunda uzama, hiperkoagülasyonda ise kısalma beklenmektedir. D-dimer düzeyindeki artışlar fibrinolitik mekanizmanın arttığını ve yaygın intravasküler koagülasyon (DIC) gibi komplikasyonların geliştiğini göstermektedir (Ghoshal ve ark., 2014). PT ve aPTT sürelerinin hiperkoagülasyon varlığını ortaya koymada yetersiz kalmaları yeni teknolojik yaklaşımlara ihtiyacı da gündeme getirmektedir.

**Tablo-4:** Hemostazis değerlendirilmesinde kullanılan laboratuvar testleri ve hedefleri

Laboratuvar analizi	Değerlendirilen hemostatik proses
Platelet sayısı	Platelet bozukluğu
aPTT	İntrinsik (ve yaygın) koagülasyon sistemi
PT	Ekstrinsik (ve yaygın) koagülasyon sistemi
TT	Yaygın koagülasyon sistemi
Fibrinojen	Fibrin üretimi
FDP – D dimer	Fibrinolizis

Son yıllarda tromboelastografi (TEG) global koagülasyon değerlendirmesi ve platelet fonksiyonlarına genel bir bakış açısından yaygın kullanım alanı bulmaya başlamıştır (Şekil-3) (Eralp ve ark., 2011; Yılmaz ve ark., 2017). TEG, canlı organizmada fizyolojik olarak gelişen bir dizi reaksiyonu *in vitro* koşullarda da taklit etmek sureti ile koagülasyon sürecini değerlendirme prensibi ile çalışmaktadır (Hobson ve ark., 2006; Salooja ve Perry, 2001). Kaolin aktive TEG özellikle insanlarda yaygın olarak kullanılmış (Audu ve ark., 2006; Hobson ve ark., 2006; Salooja ve Perry, 2001; White ve ark., 2009), son zamanlarda veteriner sahada köpekler için de referans çalışmaları yayınlanmıştır (Eralp ve ark., 2011). TEG ile

pıhtı oluşumu (R, K, alfa açısı ve MA) ve fibrinolitik sistem (LY30) ile ilgili ölçümler gerçekleştirilmektedir (Şekil-3). Bu parametrelerin birimleri ve koagülasyonla ilgili hangi detaylara açıklık getirdiği Tablo-5 ve -6 da aktarılmıştır (Salooja ve Perry, 2001).



**Şekil-3:** Tromboelastografi (TEG) trasesinin normal ve patolojik değişimlerine örnekler (A) ve TEG parametrelerinin pıhtılaşma sistemine karşılık gelen bölümleri (B) (Kell ve Pretorius, 2015).

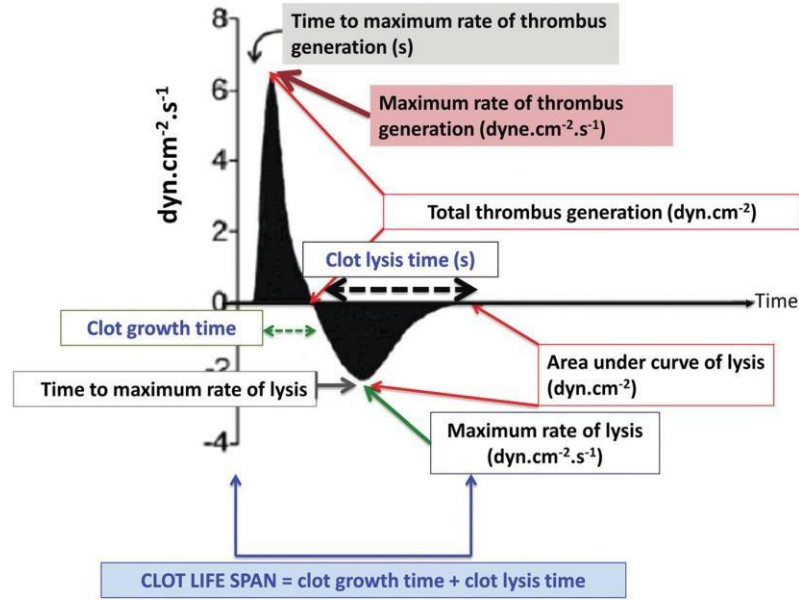
TEG'nin sağladığı diğer bir analiz ile yani Velocity Curve (V-Curve) verileri ile; trombus ve fibrinolitik sistem hakkında daha detaylı bilgiler elde edilebilmektedir. V-curve verisi; trombus oluşumu (trombus oluşumunun maksimum oranı-MRTG, MRTG için geçen süre-TMRTG ve total trombus oluşumu için geçen süre-TG) ve fibrinolitik aktivite ile ilgili parametreleri (maksimum lizis oranı-MRL, MRL'ye ulaşmak için geçen süre-TMRL ve total lizis-TL) kapsamaktadır (Şekil-4). V-curve verilerinin sepsisli köpeklerde değişimleri belirlenmiş (Kocaturk ve ark., 2017) ancak kalp yetmezliğindeki değişimleri henüz belirsiz kalmıştır.

**Tablo-5:** Tromboelastografi (TEG)'de ölçülen parametrelerin anlamı, birim ve kabul görmüş kısa ifadeleri (Salooja ve Perry, 2001)

Parametre	Birim	Detay
R süresi	Dakika	Reaksiyon süresi (pıhtının 0-2 mm amplitüde dek geçen süre)
K süresi	Dakika	Pıhtı kinetiği (pıhtı 0-2 mm amp. ulaşınca dek geçen süre)
Alfa açısı	Derece	Pıhtı kinetiği (2-20 mm amplitüd arasındaki eğim)
MA	mm	Maksimum pıhtı gücü ve stabilitesi
G	Dynes/cm <sup>2</sup>	Maksimum pıhtı gücü ve stabilitesi
LY30 - 60	%	Pıhtı lizisi

**Tablo-6:** Tromboelastografi (TEG)'de ölçülen parametreler hemostazis ile ilgili pıhtı oluşumu, stabilitesi ve lizisi ilgili detaylar vermektedir (Salooja ve Perry, 2001).

Parametre	Detay
R süresi	Pıhtılaşma faktörleri ve fonksiyonları
K ve alfa açısı	Platelet sayı ve fonksiyonları; Fibrinojen düzeyi ve fonksiyonu; Pıhtılaşma faktör aktiviteleri
MA ve G	Platelet sayı ve fonksiyonları; Fibrinojen düzeyi
LY30, LY60	Fibrinolitik sistem (d-dimer)



**Şekil-4:** TEG'de velocity curve verilerinin şematize edilmesi. V-cure verileri klasik tromboelastografi (TEG) trasesinden pıhtı rezistanslığı ile ilgili ilk bölümden hesaplanmaktadır. MRTG, maksimum trombus oluşumu; R, reaksiyon süresi; SP, split noktası; TMRTG, maksimum trombus oluşumu için geçen süre; TTG, total trombus formasyonu; D, delta (Kell ve Pretorius, 2015).

TEG'nin global pıhtılaşma sürelerine göre (PT ve aPTT) avantajları bulunmaktadır. Bu parametreler (PT ve aPTT) daha çok uzama eğilimli hastalarda (DIC ve pıhtılaşma faktörleri eksikliği gibi) tanısız önemde iken, artmış koagülasyon durumlarında sürelerde kısalma görülmesi nadirdir. Bu nedenle TEG ölçümleri koagülasyon eğilimini (hiperkoagüle) ortaya koymada avantajlı kabul edilmektedir. Bu nedenle kalp yetmezliklerinde PT ve aPTT verileri ile karşılaştırıldığında koagülasyon sürecinin tespitinde TEG ölçümlerinin daha etkili olacağı kaçınılmazdır. Koagülasyon sisteminin TEG ile analiz edilerek platelet aktivasyonunun fark edilebilir, trombus risklerinin de daha güçlü bir şekilde ortaya konabileceği düşüncesindeyiz. Bu erken uyarı sistemi; tedavide platelet aktivasyonunu sınırlayan ilaç (aspirin, klopidogrel vb.) kullanım gerekliliğine karar vermek noktasında hekimlere avantaj yaratabilecektir (Marcone vd., 2015).

### **2.3. Proteomik**

**2.3.1. Tanım:** Proteomik ve proteom terimleri Marc Wilkins tarafından 1990'larda türetilmiştir (Başaran ve ark., 2010). PROTEin ve genOM sözcüklerinden oluşan "PROTEOM"; bir organizma veya dokunun genomu tarafından ifade edilen proteinlere verilen isimdir. Proteomik olarak tanımlanan "proteom analizi" ise; proteinlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve işlevlerinin aydınlatılmasını kapsayan teknolojileri ile inanılmaz hızla ilerleyen bir bilim alanıdır. Proteomik; belli bir zamanda belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini, miktarlarını, transkripsiyon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücrelerdeki işlevlerini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimini aydınlatır. Proteomik dinamik bir terim olup farklı durum (normal ve hasta, genç ve yaşlı vb.) ve koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif analiz teknolojisi olarak tanımlanmaktadır (Başaran ve ark., 2010; Demirel, 2008)

Hastalıkların teşhisi ve tedavisi konusunda genomik çalışmalardan beklenen sonuç tam anlamıyla elde edilemediği için; özellikle son 20 yıldır bilim insanları genlerin kodladığı proteinlerin yapısını ortaya koyarak hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılabilecek proteom analiz yöntemlerini geliştirmeye devam etmektedir (Haas ve ark., 2011). Protein analizi DNA analizinden kıyaslanamayacak

kadar zordur. DNA sadece dört yapı taşıdan oluşurken doğal proteinler 20 farklı aminoasitten oluşurlar ve zincirin üç boyutlu yapısı da proteinin fonksiyonunu çok etkiler. Bir organizmanın bir genomu ama birçok proteomu vardır (Demirel, 2008).

Uygulamanın amacına göre beş tip proteomik vardır:

1. Ekspresyon Proteomik: Hücre veya dokudan ekspresse edilen proteinleri belirler
2. Yapısal Proteomik: Protein üç boyutlu tayin eder
3. Fonksiyonel Proteomik: Proteinlerin fonksiyonlarını inceler
4. Kemoproteomik: Hücreler ile hangi küçük moleküllerin etkileşeceğini inceler ve
5. Hücre-Haritası Proteomik: Protein-protein etkileşimi ve proteinlerin subsellüler yerleşimi belirler.

**2.3.2. Proteomik ve Biyobelirteç Geliştirme:** Proteomik çalışmaları biyobelirteç geliştirme çabaları için ideal bir teknoloji olarak kabul edilmektedir. Geniş çaplı protein taraması yapabilen proteomik analizler (binlerle ifade edilen serum proteinleri); zaman ve hastalığa bağlı kalp problemlerinde serumda proteinleri ortaya çıkarılarak hastalığın oluşumu ve ilerleyişi hakkında bilgiler sağlamaktadır. Böylece yeni proteinler ve bu proteinlerin diğer proteinlerle etkileşimlerinin belirlenmesi (protein network, protein-protein interaksyonu); ilgili hastalığın biyolojik prosedürlerinin anlaşılması ve detaylandırılmasına katkı vermektedir (Arab ve ark., 2006). Veteriner Hekimlik alanında “proteomikler” ile ilgili sınırlı sayıda yayın bilgi birikimi olmasına rağmen (Ceciliani ve ark., 2014), insanlarda fizyolojiden onkolojiye kadar geniş bir yelpazede detaylı çalışmalar yapılmış ve bilimsel alanda paylaşım ortamı oluşturulmuştur. Proteomik çalışmalar; hastalıkların belirlenmesinde, organ hasarı mekanizmalarının detaylandırılmasında ve yeni ilaç geliştirme çalışmalarının teknik ve bilimsel altyapısını oluşturmada önemli kabul edilmektedir (Ceciliani ve ark., 2014; Karvunidis ve ark., 2009).

Kalp hastalıklarının tanımlamasında miyokardial hasar belirteci olarak birçok parametre bildirilmiş; ancak, bunların büyük bir kısmının tanısal süreçte spesivite ve sensitivitesi düşük kalmıştır. Tanısal ve prognostik amaçla kullanılan bu tür

biyokimyasal indikatörlerin yetersizliği göze alındığında, hassas değerlendirmelerin yapılabileceği yeni biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır (Basoglu ve ark., 2014; Hinkelbein ve ark., 2009). Bu noktada, kalp hastalıklarının alt yapısında protein panelinde değişimlerinin meydana geldiğinin ortaya konması (Vistnes ve ark., 2010; Zois ve ark., 2012), belirtilen hedeflere ulaşmada yeni bir yol açmıştır (Başaran ve ark., 2010; Demirel, 2008; Karvunidis ve ark., 2009).

Serum ve hücre (platelet) proteomik çalışmaları; iki farklı durum arasındaki (normal ve hasta) proteom ekspresyonlarının karşılaştırılmasına dayanmaktadır (Demirel, 2008; Karvunidis ve ark., 2009). Bu tarz çalışmalarda hasta grubuna ait serum, doku, hücre ya da patolojik sıvılardaki proteomların kontrol grubuna göre artması (up-regüle) ya da azalması (down-regüle) istatistiksel boyutta ortaya konmaktadır. Proteomik çalışmalar ile önceden bilinmeyen proteinlerin tespitine olanak sağlanırken, genomik çalışmalarda sadece tanımlanmış genlerin ölçümü yapılabilmektedir (Kalenka ve ark., 2006). Bu nedenle proteomik çalışmalar yapılmadan önce ilgili hastalıkta bulunabilecek proteinlerin sayısı ve çeşidinin tahmin edilebilmesi mümkün değildir. Proteomik çalışmaları dinamik bir yapı göstermekte; bu metoda ait teknolojik gelişmeler devam ettikçe bulunabilecek protein ve detayları da artabilmektedir (Haas ve ark., 2011).

Proteomik ve kalp hastalıkları ile ilgili çalışmalara bakıldığında; fare (Buscemi ve ark., 2005), tavşan (Birner ve ark., 2012) ve köpek serumlarında (Sawicki ve ark., 2004) kalp yetmezliğini regüle eden bazı proteinler detaylandırılmıştır. Willingale ve ark. (2006) kalp yetmezlikli insanlarda 18 serum proteini belirleyebilmişlerdir. Bu çalışmalardaki (Berhane ve ark., 2005; Buscemi ve ark., 2005; Mebazaa ve ark., 2012; Sawicki ve ark., 2004) serum proteinlerinin daha çok hastadaki inflamasyon, signaling, gelişme ve farklılaşma, cytoskeletal, channel/reseptörler ve yeniden şekillenme (re-modeling) prosesleri ile ilgili olduğu ifade edilmiştir.

#### **2.4. Kalp Yetmezliği, Hemostazis ve Platelet Proteom İlgisi:**

Kalp yetmezlikleri insanlarda olduğu gibi köpek ve kedilerde hemostazisin bozulmasına yol açabilmekte ve plateletlerin aşırı aktivasyona bağlı trombus oluşturabilmektedir (Smith ve ark., 2016). Tromboemboli nedeni ile akciğer ve beyin

gibi organlarda gelişen dolaşım yetmezlikleri; ilgili sisteme göre spesifik klinik-patolojik bulguların ortaya çıkışına yol açmaktadır. Arteriyal tromboembolilere bağlı perakut yürüme güçlüğü ya da parapleji, akciğer embolisine bağlı solunum güçlüğü, beyin damarlarındaki trombuslara bağlı senkop ya da nöbetler gelişebilmektedir. Bu nedenle insan ve hayvanlarda kalp hastalıklarında platelet aktivasyonunu düzenleyen ilaçların kullanımı hem tedavi hem de profilaktik önemde kabul edilmektedir (Smith ve ark., 2016; Wendy, 2011).

Kalp hastalıklarında insanlarda koagülasyon dataları mutlaka izlenmektedir. Kedilerde HCM olgularında tromboemboli riski yüksek olmasına rağmen köpeklerde kalp yetmezliğinde tromboemboli riski daha az görülmektedir (Smith ve ark., 2016). Yeni teknolojik gelişimler bu konuda yeni detayların orta çıkmasına imkan yaratabilir. Geleneksel olarak insan ve veteriner hekimliğinde koagülasyon zincirini değerlendirmede kullanılan tromboelastografi (TEG) cihazı ile global hemostazis yorumlanmaktadır (Engelen ve ark., 2017; Eralp ve ark., 2011; Eralp-Inan ve ark., 2016; Kocatürk ve ark., 2016). TEG sistemine yeni bir yazılım ilavesi (Velocity cure, V-cure) ile trombus formasyonu ve fibrinolizis oluşumu hakkında detaylar elde edilir olmuştur (Engelen ve ark., 2017). Bu gelişmeler geleneksel parametrelerin (PT ve aPTT) ortaya çıkarmada düşük duyarlılıkta kaldığı koagülasyon aktivasyonuna (hiperkoagülasyon) köpeklerde kalp yetmezliği modeli ile açılım getirilebilir düşüncesindeyiz.

İnsan ve veteriner hekimliğinde geleneksel yöntemler ile yapılan çalışmalara rağmen koagülasyon sistemin aktivasyonunu ortaya koyabilecek moleküler düzeyde detay çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu gereksinimin ortaya çıkmasında; koagülasyonda primer rol oynayan plateletlerin aktive olması, morfolojik ve fonksiyonel birçok değişim göstermesi ve bu değişimlerin belirlenen yöntemlerle tam olarak ortaya konulamaması etkin olabilir. Bu aşamada son teknolojik gelişmelerle serum ve hücre bazda protein tanımlamalarının yapılabilmesi (proteomik); hastalık - sağlık sorunlarının belirlenmesinde yeni detaylar elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Burkhart ve ark., 2014).

Plateletlerin nükleuslarının olmaması sınırlı protein üretimi anlamına gelmektedir (Ghoshal ve ark., 2014). Modern platelet proteomik çalışmaları; binlerce

proteindeki kantitatif değişimleri, proteinlerdeki post-transisyonel değişimleri, protein-protein etkileşimlerini ve çok az miktarlarda olmasına rağmen protein lokalizasyonlarını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla platelet proteomik çalışmaları; platelet hemostazisini etkileyen organizmadaki temel biyolojik davranışların karakterize edilmesi ve detaylandırılmasına olanak sağlarken, hastalık ve sağlık durumlarında plateletlerin rollerini belirlemeye de imkan sağlamaktadır (Burkhart ve ark., 2014). İnsanlarda yapılan çalışmalarda (Burkhart ve ark., 2014) elde edilen platelet proteomları Tablo-7’de aktarılmış; bazılarının (fibrinojen, glikoprotein, platelet endothelial cell adhesion ve P-selectin gibi) hemostazis ve diğer biyolojik fonksiyonlardaki görevleri (inflamasyon, immun yanıtlar vb) dikkat çekmiştir (www.uniprot.org).

**Tablo-7:** Çalışmalardan elde edilen bazı platelet proteomları (Burkhart ve ark., 2012).

Accession No	Protein adı
PO2675	Fibrinojen beta chain
P50552	Vasodilator Stimule Phosphoprotein
PO8514	Integrin alfa Iıb
PO5106	Integrin beta-3
P21926	CD9 antigen
P40197	GPV: platelet glycoprotein V
PO7359	Platelet glycoprotein Ib alpha chain
P14770	Platelet glycoprotein 9
P06396	GELS: gelsolin
P16671	Platelet glycoprotein 4
P16294	Platelet endothelial cell adhesion
P16109	P-selectin
Q9HCN6	Platelet glycoprotein VI
P17301	Integrin alpha 2
PO7942	Lamin subunit beta

İnme (stroke) problemi olan insanlarda sağlıklı kontrollere göre karşılaştırıldığında, platelet proteomlarındaki değişimlerin sayısı ve çeşitliliği hastalığın oluşumunda plateletlerin ne kadar aktif rol aldığını da ortaya koyar boyuttur (Cevik ve ark., 2016). Tablo-8’de bu çalışmadan (Cevik ve ark., 2016) elde edilen ve sadece hemostazis, koagülasyon ve hücre adezyonunda görevleri tanımlanan proteinler aktarılmıştır. Tablo-8 da görüldüğü gibi felç geçiren insanlarda integrin beta-3 ve integrin alpha-IIB en fazla artan platelet proteinleri olarak dikkat çekmiştir (Cevik ve ark., 2016).



**Tablo-8:** Felçli insanlarda platelet proteomlarındaki değişimler, kontrole göre artışları, sınıf ve lokalizasyonları (Cevik ve ark., 2016).

No	Tanımlama	Kat	Sınıflama	Lokalizasyon
P0100	Alpha 1 antitrypsin	0.34	Hemostasis	Extracellular Space
P01008	Antithrombin III	1	Hemostasis	Extracellular Space
P02749	Beta 2 glycoprotein 1	1	Coagulation	Extracellular Space
P02671	Fibrinogen alpha chain	0.92	Cell adhesion	Plasma Membrane
P02675	Fibrinogen beta chain	0.81	Cell adhesion	Plasma Membrane
P02679	Fibrinojen gamma chain	1	Cell adhesion	Plasma Membrane
P04196	HRP	1	Hemostasis	Extracellular Space
Q96KK5	Histone H2A type 1 H	2	Structural	Nucleus
Q8N257	Histone H2B type 3 B	2	Structural	Nucleus
P08514	Integrin alpha IIb	2.8	Cell adhesion	Plasma Membrane
P05106	Integrin beta 3	3.76	Cell adhesion	Plasma Membrane
Q9Y624	Junctional adh. mA	0.77	Cell adhesion	Plasma Membrane
P01042	Kininogen 1	1	Hemostasis	Extracellular Space
P62937	Peptidyl prolyl cis trans	0.79	Cell adhesion	Cytoplasm
P05155	Plasma protease C1	1	Hemostasis	Extracellular Space
P00747	Plasminogen	1	Hemostasis	Extracellular Space
P14770	Platelet glycoprotein IX	0.77	Hemostasis	Plasma Membrane
P02760	Protein AMBP	1	Cell adhesion	Extracellular Space
P00734	Protrombin	1	Hemostasis	Extracellular Space
P07996	Thrombospondin 1	1.4	Cell adhesion	Extracellular Space

Köpeklerde yapılan bir çalışmada (Kocatürk ve ark., 2016) DCM'li olgularda serum proteinlerinde (n=8) önemli değişimler belirlenmiş; bu proteinlerin DCM patofizyolojisinde rol alabilecekleri ileri sürülmüştür. Koroner arter hastalığı olan insanlarda istatistiksel olarak anlamlı altı platelet proteomu belirlenmiş, bunların enerji metabolizması, hücre iskeleti tabanlı süreçler ve protein degradasyon ile ilgili olduğu ortaya konmuştur (Banfi ve ark., 2010). Trichler ve ark. (2014) sağlıklı köpeklerden platelet izolasyonu ve proteinlerini bildirilmişlerdir. Platelet proteomik çalışmaları ile ilgili insanlarda sınırlı sayıda bilgiye rağmen köpeklerde kalp yetmezliği ve platelet proteomiğini birlikte irdeleyen çalışmalar henüz oluşmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma köpeklerde kalp yetmezliği sürecinde oluşan moleküler ve biyolojik değişimleri platelet proteomik çalışması ile ortaya çıkararak literatüre katkı verebilecek düzeydedir.

Bu bilgiler ışığında bu çalışma ile kalp yetmezliği tanımlanan köpeklerde;

- 1- Platelet proteomlarının; hastalık ve sağlık durumlarının ayırımında kullanılabilirliği
- 2- Bu proteinler ile kalp yetmezliği patofizyolojisine farklı bir bakış açısı getirilmesi
- 3- Platelet proteomalarının hemostazis (koagölasyon) özelinde görevlerinin detaylandırılması ve
- 4- Hemostazis değişimlerinin TEG V-curve verileri ile ortaya konması amaçlanmıştır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmanın materyalini farklı ırk, yaş, cinsiyet ve canlı ağırlıktaki toplam 20 köpek oluşturmuş ve bu köpekler iki farklı grupta değerlendirilmiştir: Kontrol grubu (n=10) ve test grubu (n=10). Test grubu materyalini Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği'ne hasta sahibi sorumluluğu ile yani her türlü tanı ve tedavi giderlerinin sorumluluğunu alan kişilerce getirilen, muayeneler sonucunda da semptomatik düzeyde fark edilebilir ve tespit edilebilir kalp yetmezliği belirlenen köpekler oluşturmuştur. Test gurubu köpeklerin ırk, cinsiyet ve canlı ağırlıklarına benzer özellikler gösteren ancak sağlıklı olan köpekler de kontrol grubunu meydana getirmiştir. Bu yaklaşım ve uygulamalar rutin hasta değerlendirme konseptine uygun olsa da hayvan hakları açısından Bursa Uludağ Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan etik raporu alınmıştır (2016 – 12/03).

#### 3.2. Materyal seçimi

Kontrol grubunu Bursa köpek eğitim merkezi BURKEM ve Bursa K9 köpek üretim çiftliğindeki sağlıklı ve herhangi bir şikayeti olmayan köpekler oluşturmuştur. Köpekler ilgili birimde (BURKEM-K9) optimum koşullarda klinik, radyolojik, elektrokardiyografik ve ekokardiyografik olarak muayene edilmiş ve herhangi bir patoloji tespit edilmemiş olgular kontrol grubuna dahil edilmiştir. Bu ilk değerlendirmeyi takiben alınan kan örnekleri laboratuvar koşullarında değerlendirilmiş (B.U.Ü. Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi); tam kan sayımı ve serum biyokimyasal sonuçlarla birlikte serum kardiyak troponin (cTnI) düzeyleri temellinde sağlıklı olduğu belirlenen olgular çalışma kapsamında tutulmuşlardır.

Test grubunu oluşturan köpeklerin klinik süreçte gerekli tüm muayeneleri (genel muayene, kan ve serum biyokimyasal analizleri, röntgen, EKG ve ekokardiyografi) yapılmış; dilate kardiyomiyopati (DCM, n=6) veya kronik

valvular kapak hastalıklarına (CVHD, n=4) bağlı kalp yetmezliği tanımlanan olgular çalışma kapsamına alınmıştır.

### **3.3. Çalışma Dışında Bırakma Kriterleri**

Anemnezinde son bir aydır herhangi bir hastalığa ilişkin geçmişi olup ilaç kullanan ya da düzenli olarak farklı bir hastalığa karşı uzun süreli olarak aktif ilaç kullanımı bulunan vakalar çalışma dışı olarak düşünülmüştür. Bunların yanında kalp yetmezliğinin sekonder nedeni olabilecek ya da primer probleme eşlik edebilecek hastaların tespiti adına rutin hematolojik ve biyokimyasal verilerden yararlanılmıştır. Enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz nedenler varsa bu olgular çalışma kapsamı dışında tutulmuştur. Vektör aracılı hastalıkların bölgesel yaygınlığı düşünüldüğünde çalışmaya dahil edilen hastaların mutlaka hızlı tarama testleri ile muayenesi yapılmış olup; ehrlichia, lyme, dirofilaria, leishmania ve/veya anaplasma pozitif olgular çalışma kapsamına alınmamıştır. Aynı şekilde diabetes mellitus ve hipotiroidizm gibi endokrin hastalıkları belirlenen hastalar çalışma kapsamı dışında tutulmuştur. Böylece daha homojen ve analizlerinde varyasyon oluşma ihtimali daha düşük bir çalışma materyali şekillendirilmiştir. Hastalara rutin uygulamaların dışında çalışma amacına yönelik olarak herhangi ekstra invaziv bir işlem uygulanmamıştır.

### **3.4. Kalp Yetmezliği Tanımlaması**

Klinik (öksürük, asites, üfürüm vb.), radyolojik (kardiyomegali, akciğer ödemi vb.), elektrokardiyografik (taşikardi, atrial fibrilasyon vb.) ve ekokardiyografik olarak kalp yetmezliği belirlenen olgular çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Kalp yetmezliği nedeni olarak idiopatik DCM ve kronik MMVD'ye sahip olgular tercih edilmiştir (Schober ve ark., 2010). Olgu seçiminde DCM'li hastalarda ekokardiyografide fraksiyonel kasılmada (FS) azalma ile sol ventrikül ve sol atriyumda büyümesi olanlar (Tablo-9), MMVD'li hastalarda da mitral kapakların birinde veya her ikisinde kalınlaşma (endocardiosis), prolapsus ve buna bağlı orta / şiddetli derecede regürjitasyonu olanlar tercih edilmiştir (Tablo-10).

DCM tanımlamasında önerilen skorlandırma sistemi kullanılmış (Wendy, 2011); en az altı puan ve üzeri olgular çalışma kapsamına alınmıştır (Tablo-9). Kalp yetmezliğinin sınıflandırılmasında insanlardan köpeklere adapte edilen sınıflandırma yöntemi (American Collage of Internal Medicine - ACVIM) kullanılmıştır (Atkins, 2009). Bu sınıflamaya göre DCM ve MMVD'e bağlı kronik kalp yetmezliği gelişen "Sınıf C" ye ait semptomatik olgular çalışma materyalini oluşturmuştur.

**Tablo-9:** Dilate kardiyomyopati (DCM) tanı kriterleri (Wendy, 2011)

Kriterler	Tanım
<b>Ana Kriterler (Her biri 3 puan)</b>	
1. LV Dilatasyonu	LV'ün sistolik veya diyastolik çapında artma
2. LV yuvarlaklaşma indeksi	Diyastoldeki LV uzunluğunun (apeksten mitral annulusa) (LV Sphericity) diyastoldeki LV'ün kısa eksen uzunluğuna) oranı <1,65
3. Azalmış LV FS oranı Azalmış LV EF oranı	<%20-25 (İrk spesifik referans değerlerine bağlı olarak) <%40 (2D uzun eksen görüntü)
<b>Ek Kriterler (Her biri 1 puan)</b>	
Aritmi	Boxer ve Doberman gibi ırklarla daha çok ilişkili
Atriyal Fibrilasyon	
Artmış MV EPSS'si	
Artmış PEP:ET oranı	
Belirsiz aralıktaki FS	Tür spesifik değerlere göre (M-Mode)
Sol veya her iki atriyumdaki büyüme	

LV: Sol ventrikül, FS: Fraksiyonel kasılma, EF: Ejeksiyon fraksiyonu, MV: Mitral kapak, EPSS: E-noktası septal seperasyonu, PEP: pre-ejeksiyon periyodu, ET: aortik ejeksiyon zamanı.

**Tablo-10:** Mikzomatöz mitral kapak hastalığı (MMVD) tanı kriterleri (Atkins ve ark. 2009)

Grup	Tanımlama kriteri
<b>Kategori A</b>	Sağlıklı predispoze ırklar (Cavalier king charles spaniel vb.)
<b>Kategori B</b>	Sub-klinik MVD'li hastaları kapsamaktadır. MV'de üfürümü olup semptom göstermeyen, kardiyomegalisi olmayan (B1) veya olan (B2) olgular
<b>Kategori C</b>	Geçmişte ya da şuan MMVD'ye bağlı klinik şikayetleri olan olgular
<b>Kategori D</b>	MVD'ye bağlı kalp yetmezliği semptomları gösteren ve tedaviye rağmen nüks eden olgular

### 3.5. Örneklerin Toplanması ve Ölçümler

#### 3.5.1. Klinik Muayene:

Test ve kontrol grubundaki köpeklerin tüm vital bulguları değerlendirilmiş; ancak bu çalışma için öncelikli parametrelerin (beden sıcaklığı, kalp ve solunum sayısı ve kapillar yeniden dolun süresi) kayıtları alınmıştır.

#### 3.5.2. Radyolojik muayene:

Her hastadan lateral ve dorso-ventral olmak üzere iki poz toraks grafisi alınmış; vertebral kalp skoru (VHS) ölçümleri ile birlikte kalp, akciğer ve göğüs damarlarının radyografik morfolojisi değerlendirilmiştir (Schober ve ark., 2010). Radyolojik bulguların şiddetlerine göre konjestif kalp yetmezliği muhtemel olan olgular, çalışma kapsamında ileri tanısal aşamalara aktarılmışlardır (Tablo-11).

**Tablo-11:** Radyolojik bulguların varlığı ve şiddetine göre skorlandırılarak konjestif kalp yetmezliğinin belirlenmesi (Schober ve ark., 2010'dan modifiye edilmiştir).

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

**3.5.3. Elektrokardiyografi (EKG):** EKG muayenesi kontrol ve test grubu köpeklere sedatif ajan uygulanmaksızın sessiz, sakin, minimal stres koşulları olan

bir ortamda, sağ parasternal yatış pozisyonunda tekniğine uygun olarak bipolar ve unipolar ekstremite derivasyonları ile gerçekleştirilmiştir (Carewell 1103G Veteriner EKG cihazı). Elde edilen çıktıların II. derivasyonlarında ritim analizi ve ölçümler yapılmıştır (Wendy, 2011).

**3.5.4. Ekokardiyografi:** Kontrol ve test gruplarındaki köpeklere herhangi bir sedatif ajan kullanmaksızın, minimal stres koşulları sağlanan bir odada, standart görüntüleme teknikleri (sağ parasternal kısa/uzun eksen görüntüleri; sol parasternal 4-5 boşluk görüntüleri) ile kardiyak morfolojik ve fonksiyonel ölçümler yapılmıştır (Caris Plus Esaote, Italy). İki boyutlu (2-D), M-mode ve Doppler ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol gruplarında yapılan geometrik ve fonksiyonel ölçümlerde patoloji saptanan olgular çalışma dışı bırakılmıştır. Test grubundaki semptomatik olan olgularda yapılan kardiyolojik değerlendirmelerde elde edilen ölçümler köpeklerin ırk özelliği ve kilosu göz önünde bulundurularak oluşturulmuş referans ölçümlerine göre patoloji saptanmış ve tanı koyulmuştur (Boon, 2011).

Ekokardiyografik muayeneye öncesinde köpeklerin sol ve sağ axillar bölgesi kardiyak apeks noktaları ve sub-kostal muayene için ksifoid bölgesi bir el ayası genişlikte traş edilmiş, takiben ilgili bölgelere iletimi artırmak adına alkol ve ultrason jeli uygulanmıştır. Kardiyak phase array prob seçimleri (3,5 – 5 mHz, 5- 7,5 mHz, ve 7,5-10 mHz) ile ekokardiyografik muayene ön hazırlıkları tamamlanmıştır (Caris Plus Esaote, Italy) (Wendy, 2011).

Ekokardiyografik muayene tekniğine uygun olarak önce sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyi ile başlamış; bu pencereden sol ventrikül (LV) geometrik ve fonksiyonel ölçümleri yapılmıştır. Bu esnada LV duvarın kinetik yapısı gözlenmiş; akinetik (kasılmayan), hipokinetik (az kasılan) veya hiperkinetik (çok kasılan) noktalar varsa belirlenmiştir. Ritim bozuklukları (atriyal fibrasyon gibi) varsa not edilmiştir. Bu pencerede iken probun sağ yönünde hafif döndürülmesi ve bileğin biraz yukarı kaldırılması ile aortik (Ao) düzey elde edilmiştir. Bu esnada aortun merkezi olarak ve sirküler yapıda üç yapraklı (semilunal kapaklar) olacak netlikte görülmesine özen gösterilmiş; saat 6-7 yönünde sol atriyum (LA), saat 3 yönünde ana pulmoner arterin (MPA) izlenebilirliğine olanak sağlanmıştır. Bu görüntülerden LA, Ao ve MPA çapları ölçülmüştür. Bu pozisyonda bileğin sağa

doğru hareketlendirilmesi ile MPA'den k3ken alan sağ (RPA) ve sol pulmoner arterler (LPA) g3r3nt3lenmiş; çapsal ve gerektiğinde renkli Doppler 3l3mler gerçekleştirilmiştir (Boon, 2011). Çalışmanın ana hedefinde detay ekokardiyografik verilere gereksinim duyulmadığından pulmoner arter dallarının (RPA ve LPA) dataları aktarılmamıştır.

Sağ parasternal uzun eksen 4-5 boşluk g3r3nt3lemede ultrason imlecinin (k3rsır ya da line) geçirildiği yerlere g3re sırasıyla diyastolik olarak LA ve RA çapları, sistolik olarak da LVOT ve Ao k3k çapları elde edilmiştir. Beş boşluk g3r3nt3leme esnasında ultrason imlecinin ventrik3ler septuma 90 derecelik açı ve mitral kapak aılımlının tepe noktasından teğet geçer gibi yerleştirilmesi ile M- mode 3l3mler yapılmıştır. B3ylece sağ ventrik3ler diyastol apı (RVDD) ile diyastolik ve sistolik olarak interventrik3ler septum, LV ve LVFW çapları tespit edilmiştir. Cihaz tarafından y3zde EF ve FS değerleri otomatik olarak hesaplanarak ekrana yansımıştır. M-mode ile MV'in E dalgasının interventrik3ler septuma olan mesafesinin diastol sırasında 3l3m3 yapılmış; b3ylece EPSS değerleri elde edilmiştir. Bu muayeneleri takiben LA'nın sağ tarafında kalan b3l3mden pulmoner vena ve arter çapları 3l3lm3, oranları (PV/PA) tanısals3re için not edilmiştir; ancak datalar bu çalışmada 3ncelikli olmadığı için kullanılmamıştır.

Uzun eksen 4-5 boşluk g3r3nt3ler 3zellikle MMVD'lerin tanımlanmasında 3nem arz etmiştir. Mitral kapağın anterior ve posterior yaprakçıkların birbiri ile oryantasyonu ve koaptasyonu (kapanma sırasındaki sızdırmazlığı) izlenmiş; kapakıklardaki vejetasyon, kalınlaşma, deformasyon ve çapsal değerlişimler kayıt edilmiştir. Kapakıkların d3zleşmesi veya LA içine doğru deviye olmaları ile MVP varlığı tespit edilmiştir. Bu noktada renkli Doppler ile mitral reg3rgitasyon varlığı ve derecesi; MV yakınında olması ile birinci derece, LA ortasına kadar ikinci derece ve LA tabanına kadar olan reg3rgitan akımlarla 33nc3 derece olarak tanımlanmıştır (Boon, 2011).

Sağ parasternal pozisyon değerliştirilmeden 3nce tekrar Ao d3zey kısa eksen g3r3nt3ye d3n3lerek MPA'nın renkli Doppler 3l3mleri yapılmıştır. MPA kapak açılımlı netleştirildikten sonra, ultrason imleci kapak proksimaline ve akıma paralel



olacak şekilde yerleştirilmiştir (Boon, 2011). Önce CW ve sonrasında PW ölçümlerle PA maksimum velositesi ve ejeksiyon zamanları elde edilmiştir.

Sol apikal 4-5 boşluk görüntüleri sağ ve sol atriyum ve ventrikülleri çapsal ve volüm açısından değerlendirmek adına tercih edilmiş, aynı zamanda MV, TV ve Ao akımlarının renkli Doppler karakteristikleri alınabilmiştir. Ultrason imleci sırasıyla MV ve TV'nin tepe noktalarına pozisyonlandırılarak CW ve PW modunda (örneklem hacim genişliği 2 mm) seri ölçümler yapılmış; MV ve TV E/A oranları cihaz tarafından akımların taranması sonrası otomatik olarak hesaplanmıştır. Sol ventriküler aortik çıkışın net görünür hale geldiği pozisyonda akıma paralel yerleştirilen ultrason imleci ile Ao akım karakteristiği elde edilmiş, baseline çizginin altında kalan ve dik üçgen şeklindeki oluşumdan maksimum velosite ve ejeksiyon zamanları ölçülmüştür. MMVD'nin konfirmasyonu ve regürgitan akımların tespiti ve derecelendirilmesinde sol apikal görüntülemenin daha kaliteli olduğu bilindiğinden; MV açılımın net izlendiği sırada renkli akımla regürgitan akım yolu belirlenmiş ve bu yol üzerine ancak LA içine doğru imleç yerleştirilerek CW ve PW Doppler ölçümler alınmıştır. Regürgitan akımın 3 m/s'yi geçtiği olgularda dp/dt hesabı literatürde belirtildiği gibi yapılmıştır (bu datalar bu çalışmada aktarılmamıştır). Trikuspidal regürgitan akımları da irdelenmiş; böylece olası sekonder pulmoner hipertansiyon tanımlamaları literatüre uygun yapılmıştır (Boon, 2011).

**3.5.5. Laboratuvar analizleri:** Bu analizler kan sayımı, koagülasyon testleri ve serum biyokimyasal ölçümlerden oluşmuştur.

**3.5.5.1. Hematoloji:** Köpeklerin sefalik venlerinden tekniğine uygun olarak kan sayımı için EDTA'lı tüplere, koagülasyon ölçümleri için sitratlı tüplere ve serum elde etmek adına antikoagülansız tüplere yeteri miktarlarda kan örnekleri toplanmıştır. Örnekler bir saat içerisinde Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Merkez Laboratuvarı'nda hematolojik olarak (lökogram, eritrogram ve trombogram parametreleri) muayene edilmiştir (HM5, Abaxis). Hemogram datalarında hem test grubu hem de kontrol gurubunda bulunan köpeklerde başka bir hastalığı düşündürebilecek (anemi, enfeksiyöz, metabolik vb.) bulgusu olan vakalar çalışma dışında bırakılmıştır.

**3.5.5.2. Koagülasyon (hemostazis) değerlendirilmesi:** Bu amaçla sitratlı tüplere toplanan kan örneklerinde protrombin (PT) ve parsiyal tromboplastin zamanları (aPTT) ölçülmüştür. Kan numunesi alımını takiben bir saat içerisinde koagülasyon değerlendirme testleri çalışılmaya başlanmıştır. Bu amaçla Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Hastanesi Koagülasyon Laboratuvarında mevcut olan VsPro Abaxis cihazı ve bu cihaz ile uyumlu olan PT-aPTT kombine kitleri kullanılmıştır. Eş zamanlı olarak tromboelastografi (TEG) cihazı ile de (Haemoscope TEG 5000 hemostazis analizler, version 4.2, USA) platelet fonksiyonları *in-vitro* ortamda değerlendirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2017). Bu sayede R, K, alfa açısı, MA, G, LY30 gibi parametreler tespit edilmiştir. TEG içindeki yazılım ile “velosite curve” (V-cure) verileri olarak tanımlanan MRTG, TMRTG ve TG gibi parametreler belirlenmiştir (Engelen ve ark., 2017).

**3.5.5.3. Serum biyokimyasal analizler:** Serum örnekleri enzim aktiviteleri (alkalen fosfataz, alanine aminotransferaz, kreatinin kinaz ve amilaz), proteinler (albumin, globulin, total protein), elektrolitler (Ca, P), renal hasar belirteçleri (kan üre nitrojen ve kreatinin) ile glukoz ve total bilirubin yönünden değerlendirilmiştir (VetScan VS2, Abaxis). Bu amaçla Vetscan VS2 ile uyumlu çalışan Comprehensive Diagnostic Profile Rotoru kullanılmıştır. Tüm olgularda ayrıca tiroid paneli de irdelenmiş, aynı cihaz ile uyumlu olan VetScan T4/Cholesterol Reagent Rotoru (Abaxis) kullanılmıştır. Tirod paneli temelinde hipotirodi ya da hipertirodi olan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Serum kardiyak troponin ölçümü i-Stat cihazı (Abaxis) ve buna uygun kit ile değerlendirilmiştir.

**3.5.5.4. Platelet İzolasyonu:** Yapılan muayeneler sonucunda çalışmaya dahil edilen köpeklerden asit sitrat dekstrozu (ACD) tüplere tekniğine uygun şekilde ve yeterli miktarda (15-20 ml) venöz kan alınmıştır. Alınan kan örneklerinden aşağıdaki prosedür takip edilerek platelet izolatları elde edilmiştir. Bu çalışmada bu amaç için Trichler ve ark. (2014)'nın köpekler için önerdiği platelet izolasyon metodu modifiye edilmiştir.

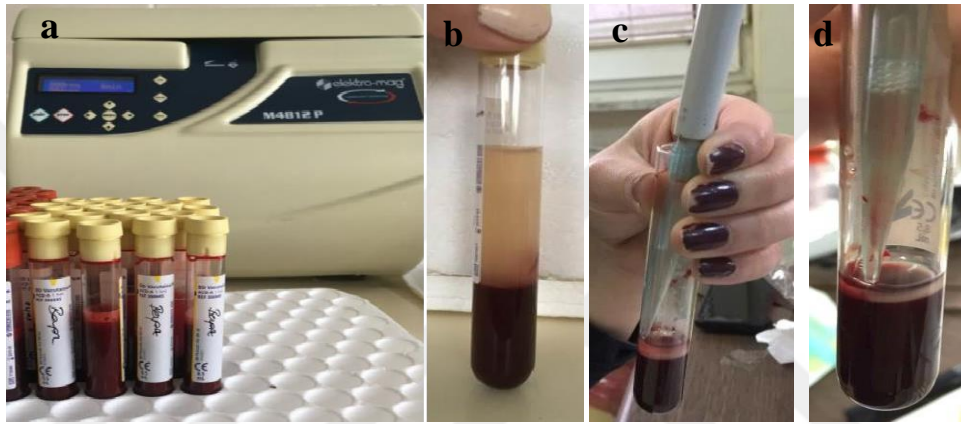
Platelet izolasyon basamakları (Şekil 5, 6 ve 7):

a. Platelet izolasyonu için 8.5 ml'lik ACD jel içeren tüplere kan alındı (Şekil- 5a)

b. Plateletten zengin plazma (PRP) içeriği elde etmek için santrifüj edildi (25 derece, 800rpm / 15dk).

c. Santrifüj sonrası supernatant; buffycoat kısmı dahil üzerinden ayrıldı (Şekil 5- b, c, d)

d. Ayrılan plazma kısmı kuru tüplere alınarak HEPES tampon çözeltisi eklendi (NaCl [sigma, 57653], HEPES [sigma, H3375], Glukoz [sigma, 16301], KCl [sigma, P9333], Magnezyum sülfat, pH 7,4'e göre hazırlandı) (Şekil 6-a) ve tekrar 1500 rpm de 15 dk santrifüje edildi.



**Şekil-5**-a: ACD içeren 8.5 ml'lik tüplere alınan kan örnekleri ve Elektromag santrifüj cihazı, b: 800rpm de 15 dk ilk santrifüj sonrası plazma ayrımı, c: Plazma ayırma işlemi, d: Buffy coat ayırma işlemi

e. Santrifüj sonrası plateletten fakir plazma (PPP) kısmı ayrıldı (üst 2/3) ve altta kalan PRP kısmına amonyum bikarbonat çözeltisi (Sigma-A6141) (Şekil 6-b) eklenerek tekrar santrifüje edildi.

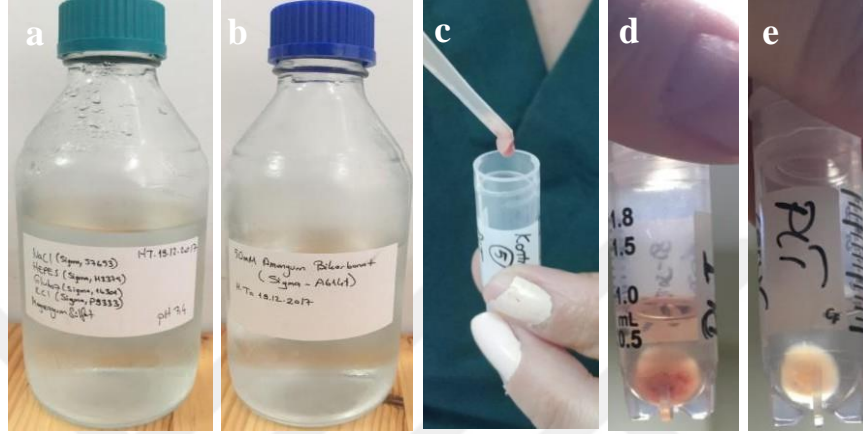
f. Elde edilen PRP 15 dakika 5000 rpm de tekrar santrifüj edildi ve yine üst 2/3'lük kısımda kalan plateletten fakir plazma (PPP) ayrıldı.

g. Platelet pelleti (Şekil 6-c) elde edilene kadar amonyum bikarbonat çözeltisi her santrifüj sonrası eklenmek üzere mevcut olan PRP'nin 5000 rpm, 15 dk. tekrar santrifüjleri yapıldı ve saf, eritrosit ve lökositten arı platelet pellet görünümü (Şekil 6-d ve e) elde edilene dek işlem tekrarlandı.

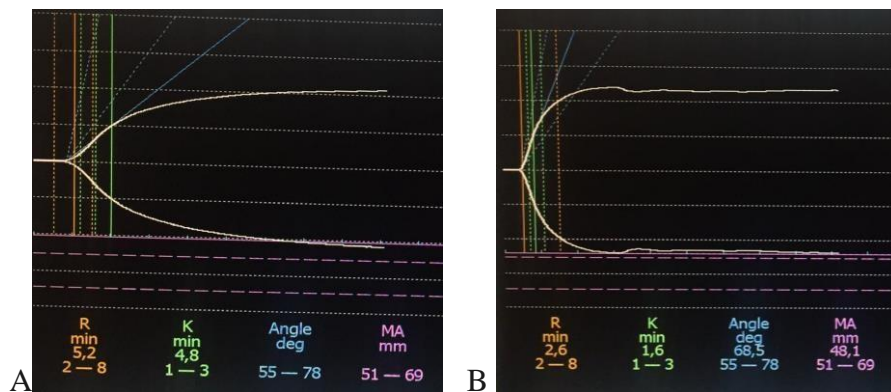
h. Platelet pelletlerinin saflığını ve hücresel kontaminasyondan (RBC ve WBC) uzak olduğunu belirlemek için; PPP ve PRP'lerden tromboelastografik (TEG) çalışma yapıldı. PPP'nin düşük (hipokoagülasyon), PRP'nin yüksek platelet içeriği

(hiperkoagülasyon) ortaya kondu (Şekil-7). Ayrıca Diff-Quik boyama ile hücreden ari platelet zenginliği konfirme edildi.

i. Elde edilen platelet pelletleri amonyum bikarbonat çözeltisi içinde -80 de cryo tüplerde tüm çalışma materyali toplanana kadar saklandı.



**Şekil-6:** a - HEPES tampon çözeltisi, b- 50 mM Amonyum Bikarbonat yıkama ve muhafaza solüsyonu, c- Platelet pelletinin cryo tüpe aktarımı, d- Amonyum bikarbonat solüsyonu ile santrifüj işlemleri arasında platelet pelleti ile eritrosit kontaminasyonu, e- Amonyum bikarbonat solüsyonu ile yıkama ve santrifüj sonrası platelet pelletinin eritrositlerden ari, son hali)



**Şekil-7:** Elde edilen plateletten fakir (PPP) ve zengin plazmaların (PRP) tromboelastografik (TEG) olarak sayı ve fonksiyonlarının değerlendirilmesi. A: PPP – hipokoagülasyon ve düşük platelet sayısı, B: PRP – hiperkoagülasyon ve yüksek platelet sayısı

### 3.6. Örneklerin saklanması

Serum örnekleri ve elde edilen platelet izolatları -80 derecede cryo tüplerde saklanmıştır. Tüm gruplardaki hedef materyal sayıları tamamlandığında (Kontrol grubu n:10 ve test grubu n:10) -80 dereceden çıkarılan örnekler kuru buz eşliğinde soğuk zincirde hizmet alımı yapılan İstanbul Acıbadem Üniversitesi Moleküler Biyokimya Laboratuvarı'na elden teslimi gerçekleştirilmiştir.

### 3.7. Proteomik Çalışmalar

Bu çalışmalar proteomik konusunda deneyimi ve makaleleri olan araştırmacı (Doç. Dr. Tarık Baykal) tarafından bağlı bulunduğu birim laboratuvarında (Acıbadem Univ. – İstanbul) hizmet alımı ile yapılmıştır. Platelet proteomiği için aşağıda belirtilen işlemler sırasıyla gerçekleştirilmiştir (Cevik ve ark., 2016):

A- Peptitlerin kromatografik olarak ayrıştırılması: Karmaşık protein örneklerinin analiz edilebilmesi için kütle spektrometresi analizi öncesinde çeşitli yöntemler ile ayrıştırılmaları yani analiz edilen karışımın basitleştirilmesi gerekmektedir. Elde edilen total protein ekstraktları tek bir seferde kütle spektrometresine verilmiş olsaydı, yüksek miktardaki proteinler düşük miktarda bulunan proteinleri maskeleyecek ve tanımlamanın kısıtlı olmasına neden olacaktır. Bu sorunu çözmek için de farklı kromatografik ayrıştırma yöntemleri uygulanabilmektedir. 1D ters faz kromatografisi (1D-RP) bütün protein örnekleri için kullanıldı.

B- 1D Ters faz kromatografisi (RP): Ayrıştırma yöntemlerinden en az zaman gerektirecek olan bir boyutlu ters faz kromatografisidir. Bu kromatografik yöntemde peptitler, C18 kolon dolgu maddesine karşı göreceli hidrofobik etkileşmelerine dayanarak farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Bu metotta peptit örnekleri öncelikle tuzak kolon adı verilen 2 cm'lik C18 kolonunda alikonur ve ardından nano pompa ile oluşturulan asetonitril gradienti ile tuzak kolondan ayrılan peptitler C18 analitik kolonunda hidrofobik etkileşimler ile ayrıştırılarak kolondan çıkar.

C- MS ve MS/MS Deney kurulumu: MS analizi kütle spektrometresi ile peptitlerin bütünü hakkında bilgi toplamak için gerçekleştirilir, MS/MS analizi ise

peptitlerin amino asit dizi bilgisinin bulunmasıdır. Kullanılan yöntem ise “data dependent acquisition” (DDA) olarak adlandırılan ve peptitlerin yüküne göre otomatik olarak belirlenen çarpışma enerjisi kullanılan kütle analizi yöntemidir.

D- Triptik peptitlerin hazırlanması: Protein ekstraksiyonu için örnekler Universal Protein Extraction (UPX) Kit (Expedeon-44101) ve proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Sci.-87785) ile karıştırıldı. Örnekler, 5x10 sn döngü ve döngüler arası 30 sn buz üstünde soğutma yapılacak şekilde sonike edildi. Sonikasyon sonrası örnekler buz üstünde bekletilerek soğutulduktan sonra 1000rpm hızda, 95°C’de 10 dk, karıştırılarak, kaynatıldı. 14.000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Supernatant alınarak, örnekler yeni tüplere alındı. Peptit eldesi FASP Protein Digestion Kit (Expedeon-44250) ve tripsin enzimi (Pierce-90057) kullanılarak yapıldı. Örneklerin son konsantrasyonu 200 ng/μL olacak şekilde %0,1 formik asit ile dilue edildi ve cihaza uygun tüplere aktarıldı.

Analizlere başlamadan önce, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS Q TOF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı (V4.1-Waters) aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları yapıldı. Metod SONAR ve sensitivite moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptitler HSS T3 (Waters-186008818) kolonunda 00 nL/dk akış hızında 132 dk’lık ters faz kromatografisi uygulandı. Peptitlerin kolondan ayrılması hidrofobikliklerine göre %5-35 asetonitril aralığında arttırılarak sağlandı ve elektrospay iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında, m/z 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0,7sn kadar MS analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0,7 sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlandı.

E- PLGS ExpressionE: Protein miktarlarındaki değişimlerin hesaplanması için kullanılacak öncelikli yazılım PLGS-ExpressionE modülüdür. Bu modül XML tabanlı informatik bileşenleri ile kalitatif ve kantitatif hesaplamaların gerçekleştirildiği protein biyobelirteç keşif platformudur.

Protein tanımlamaları yapılırken UniProt protein veri bankasındaki *canis* ailesine ait protein sekans bilgisi kullanıldı. Progenesis QIP yazılımı (Waters- 2018)

kullanarak protein tanımlaması ve istatistiksel analizi yapıldı. Yöntemde farklı hastalardan örnekler grup olarak karşılaştırılarak grupları birbirinden ayıran proteinler tanımlandı. ExpressionE modülü ile elde edilen veriler t-test filtrelemelerine tabi tutularak istatistiksel olarak anlam ifade eden protein farklılıklarının listelenmesi gerçekleştirildi.

F- Protein ifade farklılıklarının onaylanması: İstatistiksel analiz sonucunda ifadesinde anlamlı farklılıkların olduğu proteinlerin miktarındaki değişimin ikinci bir metotla onaylanması gerekmiştir. Bunun için öncelikle platelet protein karışımı SDS-PAGE ile ayrıştırılacak ve western blot ile analiz edildi.

G - SDS-PAGE Jel Analizi: SDS-PAGE analizi jel solüsyonunun, 8x10 cm (büyük cam) ve 10x7 cm (küçük cam) camların arasında polimerize edilmesiyle elde edilen jellerde gerçekleştirildi.

H - Western blot: SDS-PAGE jel elektroforez için genellikle 25-100 ug kadar protein ekstraktı kullanılmaktadır. Eşit hacimlerde 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), gliserol, %10 SDS, %0,5 bromofenol mavi ve merkaptotanol içeren tampon çözeltisi ile örnek karıştırılır ve 65°C'de 5 dk kadar kaynatıldı. Hazırlanan jelle yüklenen protein karışımı moleküler kütle standart markör'ü jel sonuna gelene kadar akım altında yürütüldü. PVDF membran uygun boyutta kesilerek önce %100 metanolde 15 saniye süreyle, daha sonra transfer solüsyonu içerisinde 15 dk hidrate edildi. Jelin üzerine membran yerleştirildi. Sonra tüm sistem tankın içine buz kalıbı da oturtularak tanka yerleştirildi. Güç kaynağı 100 volta ayarlandı. 1-1,5 saat soğukta transfer yapıldı. Membran ponceau S solüsyonuyla ya da MemCode Reversible Protein Stain Kit (Nitroselüloz membran için Kat.No. 24580, PVDF membran için 24585, Pierce) ile boyanarak proteinlerin transfer olup olmadıklarına bakıldı. Jel komasi mavi ya da İmperial Protein Stain (Kat. No. 24615, Pierce) solüsyonuna atılarak jelde protein kalıp kalmadığına bakıldı. Membran bloklama aşaması %3 albümin ya da %5 süt tozu içeren 1 x PBS ile hafif çalkalayarak 4-6 saat arasında gerçekleştirildi. İşlem önerilen yöntemlerle devam ettirildi.

I - İstatistiksel analiz ve Biyoinformatik yazılımlar: Projede elde edilen sonuçların güvenilirliğinin test edilebilmesi, yüzlerce örneğin aynı anda karşılaştırılabilmesi ve

anamlı bilgilere ulaşılabilmesi için çeşitli istatiksels hesaplamalar kullanılmıştır. Bu konudaki çeşitli yazılımlar ya laboratuvardaki bilgisayarlarda ya da web tabanlı erişimi olan programlardır. Sadece paket program olarak adlandırılan yazılımlar kullanılmış ve MATLAB gibi platformlarda kodlanmış modüller bu hesaplamaları daha karmaşık hale getirmemek için kullanılmamıştır. Proteomik araştırmalar biyoinformatik yazılımların çok yoğun olarak kullanıldığı bir bilim dalıdır. Biyolojik örneklerden binlerce peptidin aminoasit dizisinin bulunması, peptitlerden proteinlerin tanımlanması, peptit üzerindeki translasyon sonrası modifikasyonların belirlenmesi, istatiksels hesaplamalar ile tanımlama doğruluğunun tayin edilmesi, tanımlanan proteinler hakkında veri bankalarından bilgi toplanması gibi aşamalarda farklı yazılımlar kullanılmıştır.

İ - Çok değişkenli istatiksels analiz (MVA): MVA yöntemi eş zamanlı olarak farklı parametrelerin arasındaki ilişkinin matematiksels modeller ile analizidir. Yöntemde birden fazla parametreye sahip olan örnek gruplarının arasındaki benzerlikler ya da farklılıklar ham veri analiz edilerek belirlenir. MVA yöntemi çeşitli modelleri içermektedir. Bunlardan en sık kullanılanlar, PCA (principal component analysis), PLS-DA modelleridir.

J - ANOVA ve t-test: T-test iki örnek grubunun karşılaştırılarak aralarında anlamlı bir farklılığın olup olmadığını bulmak için uygulanmıştır. Projede farklı gruplardan iki tanesinin hızlı bir şekilde karşılaştırılması için t-test metodu kullanılmıştır. T-test ve ANOVA Microsoft Excel programı içindeki istatistik modülü ile yapıldı.

K - Scaffold 3 taramaları: Proteome Software firmasının Scaffold yazılımı karmaşık örneklerden LC-MS/MS metodu ile tanımlanmış yüzlerce proteinin otomatik olarak biyolojik anotasyonlarının belirlenmesi için kullanıldı. Aynı zamanda protein ve peptit tanımlamalarının istatiksels olasılıklarını hesaplayarak tanımlamaların güvenilirliği konusunda değerlendirmeler için kullanılmıştır. Scaffold 2, PLGS ya da Mascot arama motorları kullanılarak tanımlaması yapılan proteinleri XTandem motoru ile tekrar tanımlamaya çalışarak protein tanımlama hatalarını da denetler.

L - IPA ve KEGG yolak analizi: Örnekler arasındaki protein ekspresyon farklılıklarının tanımlanması yapıldıktan sonra elde edilen yüzlerce protein tanımlamasının ve istatiksels olarak anlam ifade eden protein miktar farklılıklarından



yola çıkarak karmaşık biyolojik mekanizmaların aydınlatılması gerekmiştir. Elde edilen bilgilerin hızlı bir şekilde literatürdeki binlerce sonuçla karşılaştırılması ve sonuçlardan anlam çıkarılabilmesi için derinlemesine yolak analizlerini gerçekleştirilmesi gerekmiştir. Bu analizler için KEGG yolak haritaları ve otomatik olarak gerçekleştirebilmek için de IPA web tabanlı biyoinformatik yazılımı kullanılmıştır.

### **3.8. İstatistik Yöntemler**

Bu çalışmada klinik, laboratuvar (hematolojik ve biyokimyasal) ve kardiyolojik muayene (vertebral kalp skoru, ekokardiyografik ölçümler) sonuçları iki grup karşılaştırması için (sağlıklı – kontrol ve test grupları) *student t testi* uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiş;  $P < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İlgili parametrelerin grup içlerinde median, minimum, maksimum, %25 ve %75'lik dilim ortalamaları için tanımlayıcı (descriptive) analiz metodu uygulanmıştır. Çalışmanın amacı doğrultusunda platelet sayı ve indeksleri ile tromboelastografi (TEG ve V-curve dataları) verileri arasında korelasyonlar Pearson metodu ile incelenmiştir (SigmaStat 12,0, GmbH). Proteomik analizlerinin istatistiksel çalışması ve şekilleri biyoinformatik yazılımlar temelinde hizmet alımı yapılan birimde gerçekleştirilmiştir. Platelet proteinlerinin birbiri ile olan ilgisini gösteren şekiller [www.string-db.org](http://www.string-db.org) sitesinden elde edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Klinik Bulgular

**4.1.1. Fiziksel Muayene Bulguları:** Çalışmaya dahil edilen köpeklerde kalp hastalığı ile ilgili olarak en az 3 aydır (en uzun 1,5 yıl) şikayetlerinin olduğu rapor edilmiştir. Bu şikayetlerin öncelikli olarak; çabuk yorulma (10/10), öksürük (8/10), solunum güçlüğü (2/10), karında şişlik (5/10), bayılma (2/10), iştahsızlık (7/10) ve zayıflama (4/10) olduğu not edilmiştir. Fiziksel muayenelerde kardiyak patolojilere bağlı şekillenen ve inspeksiyonda fark edilebilir düzeyde olan mukoz membran solgunluğu, asitese bağlı abdominal distensiyon, juguler vena dolgunluğu gibi parametreler hasta kayıtlarına eklenmiştir (Şekil-8).

Bu çalışmanın kontrol ve test grubunu oluşturan köpeklere ait klinik parametrelerin bazılarında ait ortalama ve standart hata değerleri ile minimum maksimum verileri Tablo-13 de aktarılmıştır. Buna göre kontrol ve test grubu köpeklerin canlı ağırlık ortalamalarının birbirine yakın olduğu, ancak minimum ve maksimum değerlerde dramatik farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Test (hasta) grubu köpeklerin ortalama yaşları ( $8,1 \pm 5,1$  yaş) ve %75'lik dilimindeki yaş ortalaması (13,2 yaş) kontrol köpeklere göre daha yüksek (sırasıyla  $3,3 \pm 3,1$  yaş,  $P < 0.01$  ve 4,2 yaş) bulunmuştur (Tablo-14).

Fiziksel muayene bulgularından bu çalışma için beden sıcaklığı ( $T^{\circ}$ ), kalp (P) ve solunum sayıları (R) ile birlikte kapillar yeniden dolum süreleri (KDS) kayıt altına alınmıştır (Tablo-13). Her iki grupta T değerleri arasında istatistiksel fark belirlenmiş olsa da ortalama, minimum ve maksimum değerleri referans aralıklarda kalmıştır. Test grubunda P, R ve KDS verileri kontrol grubunda tespit edilenlere göre daha yüksek ( $P < 0,001$ ) bulunmuştur. Test grubunda maksimum P, R ve KDS değerleri sırasıyla 182/dk, 100/dk ve 4 sn olarak not edilmiştir. Klinik muayenede kalp oskültasyonu ile mitral ve triküspit kapak punkta maksimalarından 6'lık sisteme göre en az 3 ve üzeri kardiyak üfürüm ( $4,5 \pm 1,0$ ) alınmış; üfürümlerin şiddeti prekordiyal thrill (vibrasyon) ile konfirme edilmiştir.

**4.1.2. Tansiyon Ölçümleri:** Non-invasif kan basıncı ölçümleri olarak, sistolik (SAP), diyastolik (DAP) ve ortalama (MAP) değerler tespit edilmiştir. Kontrol grubunda minimum ve maksimum değerler olarak, SAP 120 – 150 mmHg (ortalama  $\pm$  standart hata;  $136 \pm 10$  mmHg), DAP 75 - 85 mmHg ( $75 \pm 7$  mmHg) ve MAP 95 - 127 mmHg ( $105 \pm 12$  mmHg) olarak belirlenirken, test grubunda sırasıyla 130 – 165 mmHg ( $150 \pm 14$  mmHg), 85-100 mmHg ( $93 \pm 5$  mmHg) ve 135-164 mmHg ( $145 \pm 12$  mmHg) olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında ortalama DAP ve MAP değerlerinde istatistiksel farklılık ( $P=0,002$ ), SAP değerinde ise test grubunda rakamsal üstünlük söz konusu olmuştur (Tablo-15). Test grubu köpeklerin sistolik (SAP), kan basınçlarının %75'lik dilimdeki ortalaması 162 mmHg iken kontrol köpeklerinde 135 mmHg olarak not edilmiştir (Tablo-16).

**4.1.3. Radyografi:** Radyolojik olarak vertebral kalp skoru (VHS) incelendiğinde (Tablo-17, 18) kontrol grubu değerine göre test grubunda önemli bir artış belirlenmiştir ( $9,3 \pm 1,2$  ve  $12,5 \pm 1,5$ ;  $P<0.001$ ). Test grubu olgularda genel bir kardiyomegali ( $n=10$ ) ile birlikte ortak bulgular; perihilar ödem, pulmoner ödem, kaudal vena kava dilatasyonu ve yukarı deviasyonu, tracheanın dorsale deviasyonu, sağ ventriküler yapının sternuma teması ve pulmoner arter/venlerde dolgunluk saptanmıştır (Şekil-9). Olguların yarısında ( $n=5$ ) ascites, jugular dolgunluk ve hepatomegalinin birlikte olduğu dikkat çekmiştir.

**4.1.4. Elektrokardiyografi (EKG):** EKG incelemesinde ritim analizi yapılmış kontrol grubu köpeklerin tümünde sinüs ritim ( $n=10$ ) olmakla birlikte bazılarında (4/10) respiratorik sinüs aritmi saptanmıştır. Test grubu köpeklerde sinüs taşiaritmi (5/10) ve atrial fibrilasyon (4/10) tespitlerinin yanısıra atrial (3/10) ve ventriküler prematür kompleksler (3/10) tespit edilmiştir (Şekil-10). Bu ritim değerlendirmesi ile birlikte morfolojik değerlendirmeler yapılmış EKG dalgalarının süre ve voltajları incelenmiştir. Buna göre; sol atriyal büyüme (p- mitrale, 5/10), sağ atriyal büyüme (p-pulmonale, 3/10), sol ventriküler büyüme (5/10), küçük QRS kompleks oluşumu (2/10), ST depresyonu (2/10) ve sol veya sağ aksis deviasyonu (5/10) öncelikli bulgular olmuştur.

**4.1.5. Ekokardiyografi:** Bu çalışma planına uygun olarak tanısal önemde olan ekokardiyografik veriler kayıt altına alınmıştır. Sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyinden M-mode ölçümleri ile LV ilişkili geometrik ve

fonksiyonel değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir. Buna göre kalp siklusu içerisinde birbirini takip edecek şekilde diyastol ve sistolde sağ ventrikül (RVDD), interventriküler septum (IVSDd ve IVSDs), sol ventrikül (LVDD ve LVDs) ve sol ventrikül serbest duvar (LVFWDD ve LVFWDs) lmleri yapılmıştır.

Kalp yetmezliği saptanan olgulara yapılan ekokardiyografik muayenelerde sıklıkla sol atriyal dilatasyon, mitral kapak kalınlaşması ve prolapsusu, mitral ya da trikuspidal yetmezlik akımları saptanmıştır (şekil -11, -12, -13).

Kontrol ve test gruplarının sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyinden alınan M-mode ölçümlerinin ortalama ve standart hataları Tablo-19 da aktarılmıştır. Yapılan lmlerde; RVDD kontrole göre ( $0,6 \pm 0,2$  cm) test grubunda önemli ölçüde yüksek belirlenmiştir ( $4,2 \pm 2,1$  cm;  $P<0,01$ ). IVS ve LVFW diyastol ve sistol ölçümlerinde gruplar arasında istatikselsel boyutta farklılık oluşmamış; ancak, LVDD ve LVDs değerleri test grubunda daha yüksek tespit edilmiştir ( $P<0,01$ ). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EPSS değeri test grubunda anlamlı yükselim göstermiştir ( $0,31 \pm 0,11$  cm ve  $0,68 \pm 0,21$  cm;  $P<0,01$ ). LV ilişkili FS ve EF düzeyleri test grubunda (sırasıyla %  $26,0 \pm 6,4$  ve %  $48,0 \pm 9,7$ ) sağlıklı kontrollere göre ( $34,4 \pm 3,8$  ve  $61,6 \pm 9,2$ ) daha düşük belirlenmiştir ( $P<0,05$ ).

Bu tespitlerle birlikte kontrol grubunda LV'nin minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 2,2 cm ve 3,5 cm iken, test grubunda 4,4 cm ve 5,5 cm olarak not edilmiştir. Test grubunun %75'lik diliminde ortalama LVDD 5,45 cm, oysa kontrol grubunda 3,56 cm olarak kayıt edilmiştir. Kontrol grubu FS aralığı %30 - 39, test grubunda ise %20 - 35 olarak belirlenmiştir (Tablo - 20). EPSS değerinin test grubunda 0,6-1,0 cm aralığındaki değişimi dikkat çekici bulunmuştur.

Ao, LA ve MPA arter çapları irdelendiğinde (Tablo - 21, -22); gruplar arasında Ao ve MPA çapları arasında istatikselsel farklılık oluşmazken, test grubunda LA apı ( $4,7 \pm 2,8$  cm) kontrole göre ( $2,1 \pm 0,2$  cm) nemli değişim göstermiştir. Bu farklılığa paralel olarak, LA/Ao oranı da test grubunda daha yüksek tespit edilmiştir ( $0,9 \pm 0,2$  ve  $2,6 \pm 0,9$ ;  $P<0,001$ ). LA apı kontrol grubunda 1,8 - 2,5 cm aralığında test grubunda ise 2,5 - 8,0 cm aralığında dikkat çekmiştir.

Doppler lmlerinde MPA ve Ao damarlardaki akım ile kalp kapaklarındaki (MV ve TV) akımlar değerlendirilmiş ve yapılan istatikselsel çalışma sonuçları Tablo-23 ve 24'te aktarılmıştır. Ao ve MPA maksimal velositeleri gruplar arasında

önemsiz varyasyon göstermiştir. Ao ejeksiyon süresi (ET) test grubunda kontrollere göre daha kısa not edilmiştir (P=0,057). MV-E/A oranı her iki grup arasında önemli, ancak TV-E/A önemsiz değişim göstermiştir. MV-E/A oranı kontrol grubunda 1,2 - 2,2 aralığında, test grubunda ise 2,4 - 5,5 aralığında saptanmıştır.

## 4.2. Laboratuvar Bulguları

**4.2.1. Hematolojik Bulgular:** Lökogram (Tablo-25, 26), eritrogram (Tablo-27) ve trombogram (Tablo-29) verileri aktarılmıştır. Lökogram verilerinde total lökosit (WBC) ve diferensiyel lökosit sayıları gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Ortalama değerlere yansımayan bu değişimlere rağmen test grubunda maksimum WBC ve nötrofil sayılarının sırasıyla 21.900/ $\mu$ L ve 15.500/ $\mu$ L olduğu dikkat çekmiştir. Bazofil sayısı test grubunda kontrollere göre daha düşük belirlense de referans aralıklarda kalmıştır.

Eritrogram değerlerinde lökogram da olduğu gibi her iki grup ortalamalarında istatistiksel önemde farklılıklar tespit edilememiştir (Tablo-27). Kontrol ve test grubunun eritrosit (RBC) sayısı ile hemoglobin, hematokrit (Hct) ve eritrosit indeks değerleri (MCV, MCH, MCHC ve RDW) normal sınırlar içinde kalmıştır. Hct değerinin test grubunda maksimum %54,2 olması ve bu materyalin %75'lik diliminde %50,8 belirlenmesi dikkate değer görülmüştür. Test grubunda MCV minimum 53,8 fl olarak kayıt edilmiştir (Tablo-28).

Trombogram değerleri olarak platelet sayısı (PLT) ve indeksleri (PCT, MPV ve PDW) kayıt altına alınmıştır. Ortalama değerler incelendiğinde; test grubunda PDW değeri ( $26 \pm 12$ ) kontrole göre daha düşük çıkarken ( $39 \pm 2$ ,  $P < 0,01$ ), PCT değeri daha yüksek belirlenmiştir ( $2,0 \pm 2,3$  ve  $0,3 \pm 0,5$ ;  $P < 0,05$ ). Test grubunda PLT sayısının %25 ve %75'lik dilimdeki dağılımı sırasıyla  $204 \times 10^3/\mu$ L ve  $461 \times 10^3/\mu$ L olarak saptanmıştır (Tablo-30).

**4.2.2. Serum Biyokimyasal Bulgular:** Kardiyak biyobelirteç olarak serum kardiyak troponin I (cTnI) çalışılmış; test grubu ortalama değeri ( $0,15 \pm 0,1$  ng/mL;  $P=0,02$ ) kontrole göre ( $0,04 \pm 0,02$  ng/mL) daha yüksek bulunmuştur (Tablo-31, Şekil-14). Kontrol grubunda cTnI  $0,01 - 0,08$  ng/dL aralığında, test grubunda ise  $0,04 - 0,32$  ng/dL aralığında belirlenmiştir. Test popülasyonunun %75'lik diliminde serum cTnI düzeyi ortalaması  $0,24$  ng/dL olarak kayıt edilmiştir (Tablo-32).

Kapsamlı profil rotoru ile 14 parametre incelenmiştir (Tablo-33). Her iki grup arasında analiz edilen parametrelerde istatistiksel önemde farklılık belirlenmemiştir. Test grubunda serum karaciğer enzim (ALT ve ALP) düzeyleri kontrole göre daha yüksek olmasına rağmen standart hataları da çok yüksek çıkmıştır. Kontrol grubunda tüm parametrelerin en alt ve üst değerleri sağlıklı köpek değerleri için bildirilen aralıklarda tespit edilmişken; test grubunda serum ALT ve ALP'nin en üst değerleri sırasıyla 305 IU/L ve 294 IU/L olarak kayıt edilmiştir. Böbrek fonksiyonları açısından serum BUN ve Cr değerleri test grubunda üst sınırlar olarak (sırasıyla 165 mg/dL ve 2,8 mg/dL) kontrollere göre (21 mg/dL ve 1,0 mg/dL) önemli derecede yüksek bulunmuştur (Tablo-34). Test grubunda BUN değerinde ( $37 \pm 52$  mg/dL) kontrol grubuna göre ( $14 \pm 4$  mg/dL) standart hatanın yüksek olduğu fark edilmiştir.

Tiroid paneli olarak serum total tiroksin (T4) ve kolesterol düzeyleri incelenmiştir (Tablo-35). Her iki grup arasında T4 ve kolesterol açısından istatistiksel önemde farklılık belirlenmemiştir. Serum T4 kontrol ve test gruplarında minimum sırasıyla 2,6 µg/dL ve 1,3 µg/dL olarak, maksimum da 3,8 µg/dL ve 3,6 µg/dL olarak not edilmiştir. Maksimum serum kolesterol değerlerinin her iki grupta birbirine yakın olduğu (270-280 mg/dL) tespit edilmiştir (Tablo-36).

**4.2.3. Hemostazis değerlendirilmesi:** Bu amaçla global pıhtılaşma süreleri (PT-aPTT) ve TEG ölçümleri yapılmış, TEG - Velosite curve (V-curve) verileri ile detaylar elde edilmiştir.

Tablo-37 PT ve aPTT değerlerinin gruplar arasındaki değişimlerini, Tablo - 38 de minimum ve maksimum tespitleri yansıtmaktadır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında test grubunda P değerinin sırasıyla  $16,4 \pm 0,4$  sn ve  $19,0 \pm 0,9$  sn ( $P<0,001$ ), aPTT'nin de  $92,4 \pm 4,8$  sn ve  $146,2 \pm 77,4$  sn ( $P=0,08$ ) olduğu görülmüştür. PT ve aPTT'nin maksimum değerleri kontrol grubunda sırasıyla 17,2 sn ve 99,9 sn belirlenmişken, aynı parametreler için test grubunda 19,7 sn ve 201,0 sn tespitleri yapılmıştır.

TEG ile yapılan muayenelerde bu çalışma kapsamına alınan parametreler; R süresi, K süreleri ve alfa açısı ile birlikte MA, PMA, G, EPL, A, CL ve LY30 değerleridir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında test grubu köpeklerde ölçüm

yapılan parametrelerle ilgili istatistiksel önemde farklılıklar oluşmamakla birlikte R, K, EPL ve LY30 değerlerin rakamsal olarak yüksek kaldığı; alfa açısı, MA, G ve CL değerlerinin ise kısmen düşük kaldığı tespit edilmiştir (Tablo-39). Test grubunda minimum ve maksimum R ( $0,8 - 4,5$  sn;  $3,6 \pm 1,0$  sn) ve K süreleri ( $2,7-6,5$  sn;  $4,0 \pm 2,1$  sn) kontrol grubu değerlerine göre (R:  $1,2 - 4,1$  sn;  $2,2 \pm 1,0$  sn ve K:  $0,8 - 4,5$  sn;  $2,6 \pm 1,5$  sn) daha uzun belirlenmiştir. Kontrol grubunda alfa açısı ve MA değeri aralığı 42-80 derece ve 31-53 mm iken, test grubunda sırasıyla 35-57 derece ve 36-53 mm olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda LY30 değeri % 0,0 – 12,0 aralığında, test grubunda ise % 0,0 – 40,1 şeklinde saptanmıştır (Tablo-40). Kalp yetmezlikli olgulardan DCM’li ve CVHD’li birer vakadan örnek TEG grafikleri Şekil-15’te gösterilmiştir.

V-curve analizinde bakılan parametreler; MRTG, TMRTG, TG, MRL, TMRL ve L den oluşmuştur (Tablo-41, 42). Test grubu MRL ( $5,3 \pm 0,1$  mm/sn), TMRL ( $30,6 \pm 0,5$  sn) ve L değerleri ( $281 \pm 83$  sn) kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel düzeyde ( $P < 0,05 - 0,002$ ) artış göstermiştir. Test grubundaki TMRTG değeri ( $5,0 \pm 1,7$  sn) kontrole göre önemli ölçüde ( $3,0 \pm 1,4$  sn) yüksek belirlenmiş; ancak, istatistiksel düzeyde anlamlı ( $P=0,07$ ) olmamıştır. Her iki grup arasında MRTG ve TG parametrelerinde istatistiksel önemde bir farklılık oluşmamıştır. Şekil-15’te verilen DCM ve CVHD’li hastaların TEG V-Curve profilleri Şekil-16’da aktarılmıştır.

Platelet sayı ve indekslerinin TEG ve V-Curve verileri ile korelasyonları Tablo-43’te aktarılmıştır.

### **4.3. Platelet Proteomik Bulguları:**

Platelet proteomları *Caniformidae* (deniz memelilerini de kapsayan üst sınıf), *Canidae* (köpek ailesi; çakal, tilki dahil) ve *Canis lupus familiaris* (evcil köpek) veri tabanına göre daha önce tanımlanmış proteinlere (reviewed proteins) göre listelenmiş; kontrole göre en az  $P < 0,05$  düzeyinde ve 1,2 kattan fazla değişim gösteren proteomlar anlamlı kabul edilmişlerdir. Tablo-12 de her üç gruba ait tanımlanan toplam ve bunlar içinde istatistiksel düzeyde anlamlı olan protein sayıları aktarılmıştır.

**Tablo-12:** Familya gruplarına göre tanımlanan toplam ve anlamlı protein sayıları

Familya gen ontolojisi	Tanımlanan protein sayısı	Anlamlı protein sayısı
Caniformidae	1703	181
Canidae	97	7
Canis lupus familiaris	107	10

Bu çalışmada adı geçen verilerden sadece evcil köpek (*Canis lupus familiaris*) için olan protein tanımlamaları (toplam 107, anlamlı 10 protein) aktarılmıştır. İzole edilen platelet proteomlarının erişim (accession) numarası, değişim oranı ve peptid sayıları Tablo-44’de, reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına (m/z) göre genel dağılımları da Şekil-17’de gösterilmektedir.

Tablo-44 ve Şekil-17’de görüldüğü gibi kontrol grubu değerler ile karşılaştırıldığında test (hasta) grubunda bazı proteinlerde artma (n=4), bazı proteinlerde de azalma (n=6) saptanmıştır. Platelet proteomlarının moleküler - biyolojik fonksiyonları ve birbirleri ile bağlantıları (recoctome analizi) Şekil-18’de, kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının (n=10) moleküler fonksiyonları ve dağılımları Şekil-19’da, biyolojik fonksiyonları ve dağılımları Şekil-20’de, sellüler yapılarıdaki dağılımları Şekil-21’de, yolak (pathway) analizleri Şekil-22’de ve protein sınıfları da Şekil-23 de aktarılmıştır.

İstatistiksel anlamda kontrollere göre değişim gösteren tüm proteinlerin erişim numaraları, peptid sayıları ve skorları Tablo-45’te, değişim yönleri de (up-regülasyon ve down regülasyon) Şekil-24’de aktarılmıştır. Test grubunda artan proteinler apolipoprotein C-III (Şekil-25), apolipoprotein A-II (Şekil-26), guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (Şekil-27) ve clusterin (Şekil-28), azalan proteinler de cathepsin D (Şekil-29), cytochrome C oxidase subunit 2 (Şekil-30), C-X-C motif chemokine 10 (Şekil-31), serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (Şekil-32), myotrophin (Şekil-33) ve creatine kinase B-type (Şekil-34) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada platelet izolatlarından anlamlı değişim gösterenlerin (n=10) birbiri ile olan moleküler ve biyolojik ilgileri Şekil-35’de, *Canis lupus familiaris* protein data bankına göre tanımlanan tüm proteinlerin (n=107) intetaksiyonu da Şekil-36 da aktarılmıştır. RAB proteinleri, MMP’ler ile apoliporoteiner (Apo) arasındaki yoğun bağlantı dikkat çekmiştir.



## Bu çalışmaya ait bulguları içeren Tablo ve Şekiller:

**Tablo-13:** Kontrol ve test grubu olguların signalement ve bazı klinik bulguları; ortalama  $\pm$  standart hata

Parametre	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
CA, Kg	25,2 $\pm$ 6,5	22,4 $\pm$ 19,4	0,338
Yaş – yıl	3,3 $\pm$ 1,1	8,1 $\pm$ 5,1	0,009
T °C	38,3 $\pm$ 0,2	38,7 $\pm$ 0,3	0,005
P /dk	111 $\pm$ 8	146 $\pm$ 28	0,001
R /dk	27 $\pm$ 7	68 $\pm$ 21	<0,001
KDS, sn	1,6 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,8	0,002

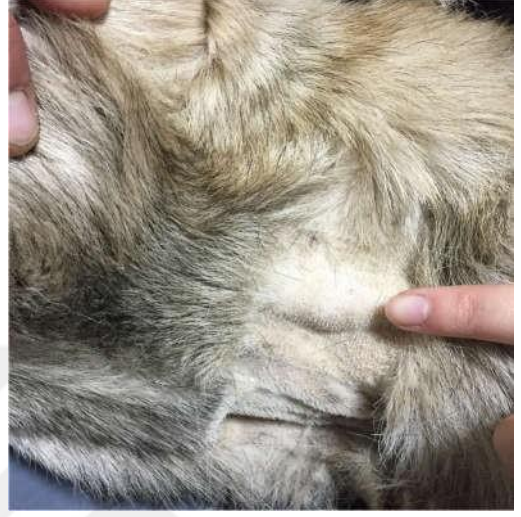
CA: Canlı ağırlık T: Beden sıcaklığı, P: Pulzasyon, R: Respirasyon, KDS: Kapillar yeniden dolun süresi

**Tablo-14:** Kontrol ve test grubu olguların signalement ve bazı klinik bulgularının median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamaları

Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75	
CA, Kg	Kontrol	24,0	16,0	35,0	19,5	30,7
	Test	15,0	2,5	60,0	7,7	41,2
Yaş – yıl	Kontrol	3,0	2,0	5,0	2,0	4,2
	Test	8,5	0,5	15,0	3,2	13,2
T °C	Kontrol	38,4	38,0	38,8	30,0	38,5
	Test	38,7	38,2	39,5	38,5	38,9
P /dk	Kontrol	110	100	120	100	120
	Test	150	100	182	120	174
R /dk	Kontrol	24	20	40	24	34
	Test	62	40	100	55	85
KDS, sn	Kontrol	2,0	1,0	2,0	1,0	2,0
	Test	2,5	2,0	4,0	2,0	3,2



A



B



C



D

**Şekil-8:** DCM'ye bağlı konjestif kalp yetmezliği gelişen bir köpekte; solgun müköz membran (A), jugular dolgunluk (B), dorsoventral bakış (C) ve lateral yatış halinde abdominal yüzey venlerinde dolgunluk ve asites (D)

**Tablo-15:** Kontrol ve test grubu olguların sistolik (SAP), diyastolik (DAP) ve ortalama kan basınçları (MAP); ortalama  $\pm$  standart hata

Parametre mmHg	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
SAP	136 $\pm$ 10	150 $\pm$ 14	0,252
DAP	75 $\pm$ 7	93 $\pm$ 5	0,002
MAP	105 $\pm$ 12	145 $\pm$ 12	0,002

**Tablo-16** Kontrol ve test gruplarında sistolik (SAP), diyastolik (DAP) ve ortalama kan basınçları (MAP); median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamaları

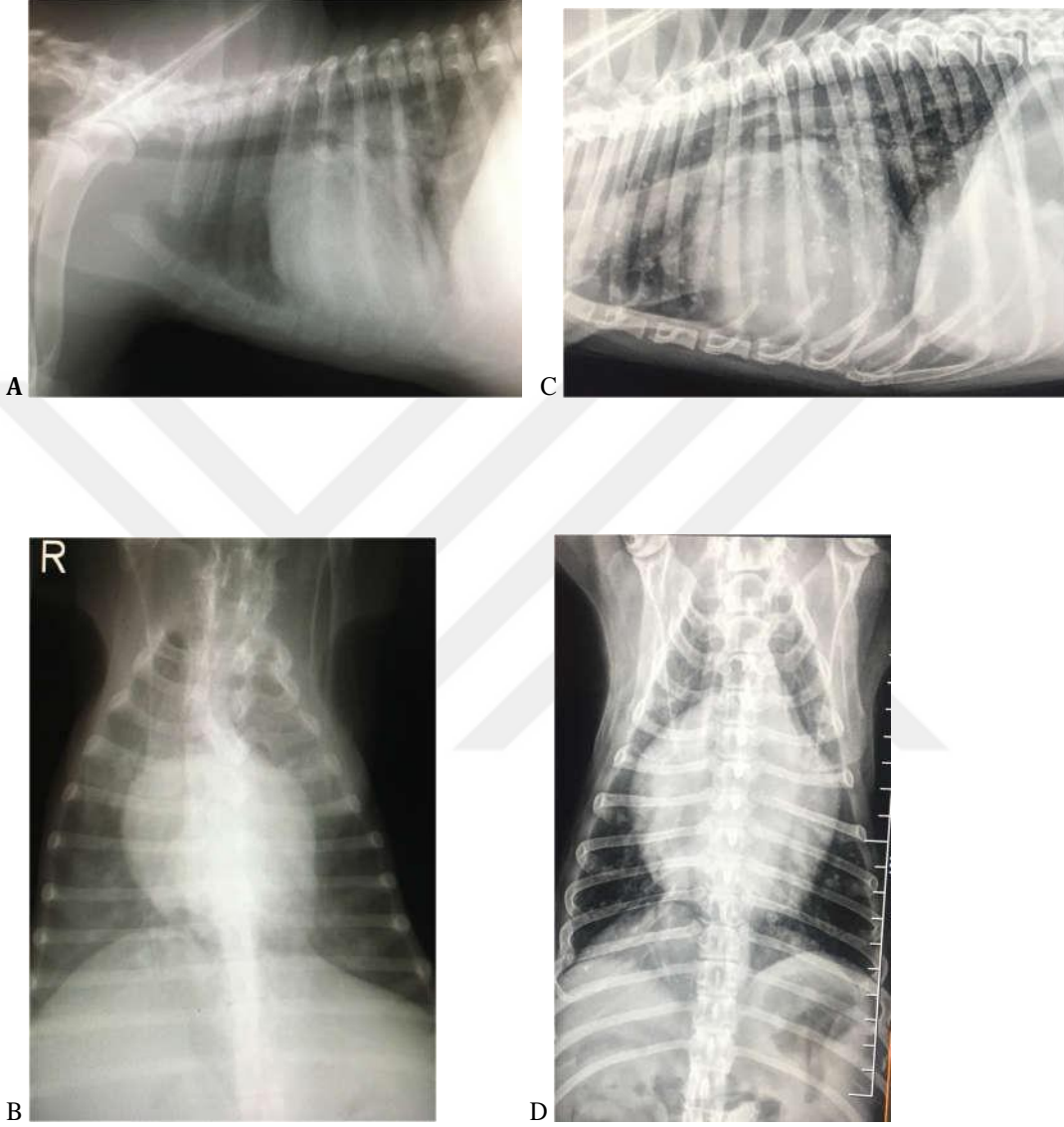
Parametre mmHg	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
SAP	Kontrol	130	120	150	120	135
	Test	155	130	165	135	162
DAP	Kontrol	70	70	85	70	82
	Test	95	85	100	87	98
MAP	Kontrol	105	95	125	95	116
	Test	141	135	164	136	158

**Tablo-17:** Kontrol ve test grubu olguların vertebral kalp skorları (VHS); ortalama  $\pm$  standart hata

Parametre	Kontrol, n = 10	Test, n = 10	P değeri
VHS	9,3 $\pm$ 1,2	12,5 $\pm$ 1,5	<0,001

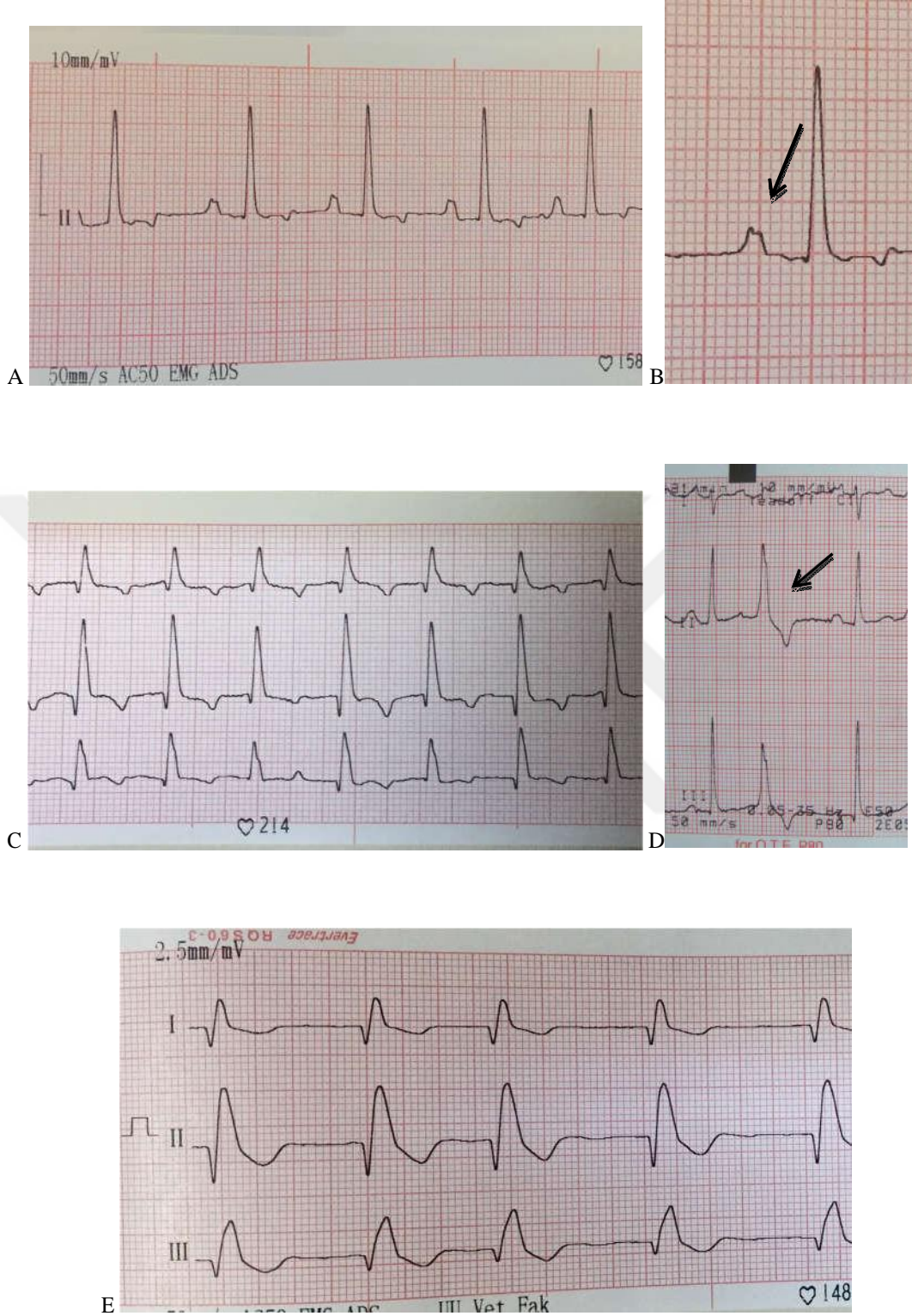
**Tablo-18:** Kontrol ve test grubu olguların vertebral kalp skorları (VHS); median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamaları

	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
VHS	Kontrol	10,1	8,5	10,7	8,6	8,9
	Test	11,5	11,0	13,2	11,8	12,5



**Şekil-9:** DCM'ye (A-B) ve MMVD'e bağlı konjestif kalp yetmezliği gelişen olgulardaki (C-D) radyolojik değişiklikler: A ve B'ye göre C ve D'deki kardiyomegali, perihilar ödem, trekheal dorsal deviasyon, v. caval dolgunluğu ve sol atriyal büyümenin daha şiddetli olduğu görülmekte. B; yaygın intersitisyel desen ve asites varlığı





**Şekil-10:** Konjestif kalp yetmezliği olan köpeklerden EKG örnekleri; Sinus taşikardi (A), P- mitrale (B), atriyal fibrilasyon (C ve E), ventriküler ekstrasistol (ok, D) ve sol dal bloğu (E)

**Tablo-19:** Kontrol ve test grubu olguların sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyden alınan M-mode ölçümleri; ortalama  $\pm$  standart hata (cm – santimetre)

Parametre	Kontrol	Test	P değeri
cm	n = 10	n = 10	
<b>RVDd</b>	0,6 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 2,1	0,005
<b>IVSd</b>	1,1 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,1	0,571
<b>LVDd</b>	3,0 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0,4	0,007
<b>LVPWd</b>	1,2 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,4	0,544
<b>IVSs</b>	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,1	0,936
<b>LVDs</b>	2,1 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,3	0,012
<b>LVPWs</b>	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,3	0,886
<b>EPSS</b>	0,3 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,001
<b>FS %</b>	34,4 $\pm$ 3,8	26,0 $\pm$ 6,4	0,031
<b>EF %</b>	61,6 $\pm$ 9,2	48,0 $\pm$ 9,7	0,033

RVDd - Sağ ventrikül diyastal çapı; interventriküler septum diyastal (IVSd) ve sistol çapı (IVSs); sol ventrikü diyastol (LVDd) ve sistol çapı (LVSd); sol ventrikül serbest duvar diyastol (LVFWd) ve sistol çapı (LVFWs); EPSS – mitral kapak E dalgasının ventriküler septuma mesafesi; FS – fraksiyonel kasılma; ve EF – ejeksiyon fraksiyonu

**Tablo-20:** Kontrol ve test grubu olguların sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyden alınan M-mode ölçümleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar (cm – santimetre)

	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
cm						
<b>RVDd</b>	Kontrol	0,6	0,2	0,9	0,3	0,8
	Test	4,0	2,0	6,7	2,1	6,3
<b>IVSd</b>	Kontrol	1,2	0,6	1,7	0,7	1,4
	Test	0,7	0,6	0,8	0,6	0,8
<b>LVDD</b>	Kontrol	3,3	2,2	3,5	2,2	3,5
	Test	5,0	4,4	5,5	4,5	5,4
<b>LVPWd</b>	Kontrol	1,1	1,0	1,5	1,0	1,3
	Test	1,1	1,1	1,8	1,1	1,8
<b>IVSs</b>	Kontrol	1,0	0,8	1,7	0,9	1,3
	Test	1,1	1,0	1,2	1,0	1,2
<b>LVDS</b>	Kontrol	2,2	1,4	2,6	1,5	2,5
	Test	3,2	2,9	3,5	2,9	3,5
<b>LVPWs</b>	Kontrol	1,1	1,0	1,4	1,0	1,3
	Test	1,3	0,7	1,4	0,7	1,4
<b>EPSS</b>	Kontrol	0,3	0,2	0,5	0,2	0,4
	Test	0,8	0,6	1,0	0,7	1,0
<b>FS %</b>	Kontrol	35,0	30,0	39,0	30,5	38,0
	Test	23,5	20,0	35,0	20,7	33,5
<b>EF %</b>	Kontrol	62,5	46,0	71,0	55,0	70,2
	Test	44,0	40,0	61,0	41,5	56,5

RVDd - Sağ ventrikül diyastal çapı; interventriküler septum diyastol (IVSd) ve sistol çapı (IVSs); sol ventrikül diyastol (LVDD) ve sistol çapı (LVDS); sol ventrikül serbest duvar diyastol (LVFWd) ve sistol çapı (LVFWs); FS – fraksiyonel kasılma; EF – ejeksiyon fraksiyonu; ve EPSS – mitral kapak E dalgasının ventriküler septuma olan mesafesi

**Tablo-21:** Kontrol ve test grubu olguların sağ parasternal kısa eksen aort düzey çapsal ölçümleri.  
Ao: Aort, LA: Sol atriyum ve MPA: Ana pulmoner arter (ortalama  $\pm$  standart hata), cm - santimetre

Parametre	Kontrol	Test	P değeri
cm	n = 10	n = 10	
<b>Ao</b>	1,9 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,2	0,421
<b>LA</b>	2,1 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 2,8	0,07
<b>MPA</b>	1,6 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,8	0,376
<b>LA/Ao</b>	0,9 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,9	0,001

**Tablo-22:** Kontrol ve test grubu olguların sağ parasternal kısa eksen aort düzey çapsal ölçümler; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

cm	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
<b>Ao</b>	<b>Kontrol</b>	2,0	1,6	2,4	1,7	2,4
	<b>Test</b>	1,5	1,7	2,7	1,6	2,6
<b>LA</b>	<b>Kontrol</b>	2,2	1,8	2,5	2,0	2,4
	<b>Test</b>	3,6	2,5	8,0	2,6	5,8
<b>MPA</b>	<b>Kontrol</b>	1,7	1,5	1,8	1,6	1,8
	<b>Test</b>	1,3	1,2	3,1	1,2	2,2

Ao: Aort, LA: Sol atriyum ve MPA: Ana pulmoner arter, cm - santimetre



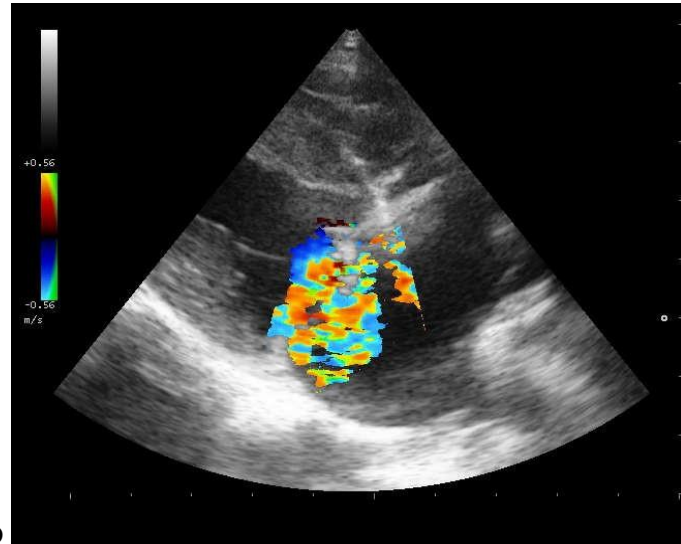
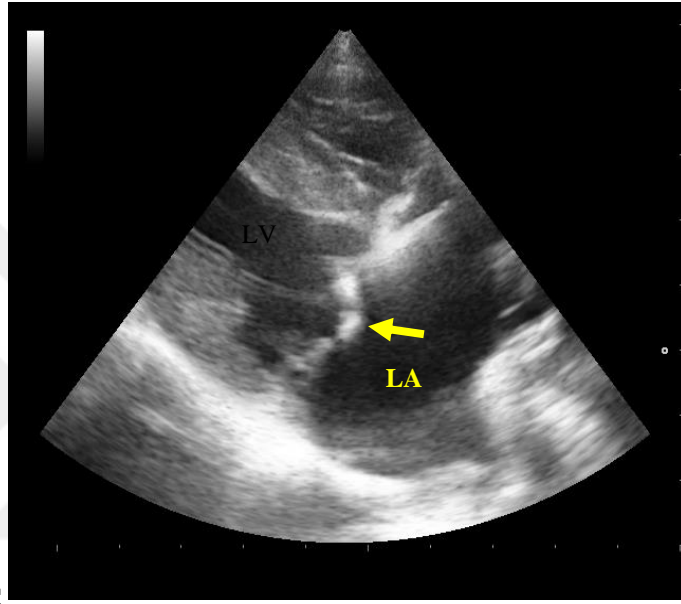
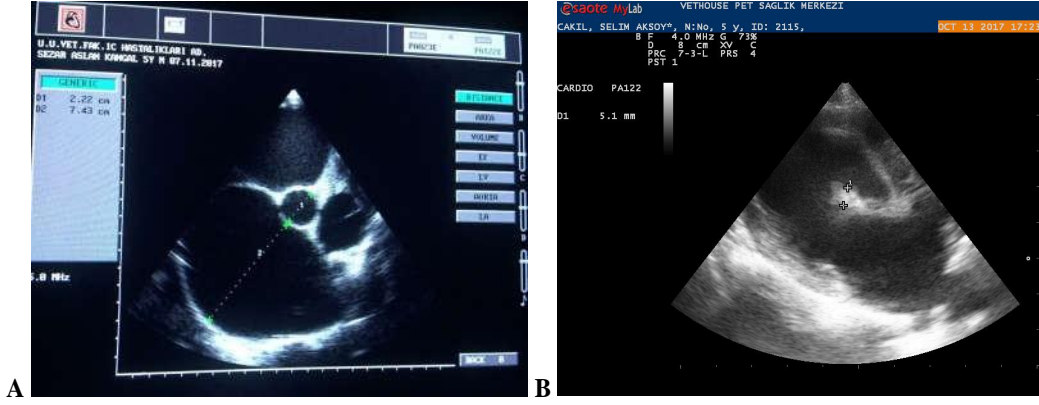
**Tablo-23:** Kontrol ve test grubu olguların pulmoner arter (PA), aort (Ao), mitral kapak (MV) ve trikuspid kapak (TV) Doppler ölçümleri (ortalama  $\pm$  standart hata)

Parametre	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
PA Vmax mmHg	0,8 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,4	0,280
Ao Vmax mmHg	1,0 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,4	0,231
Ao ET m/s	205 $\pm$ 16	162 $\pm$ 42	0,057
MV E/A	1,5 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 1,5	0,05
TV E/A	1,2 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	0,135

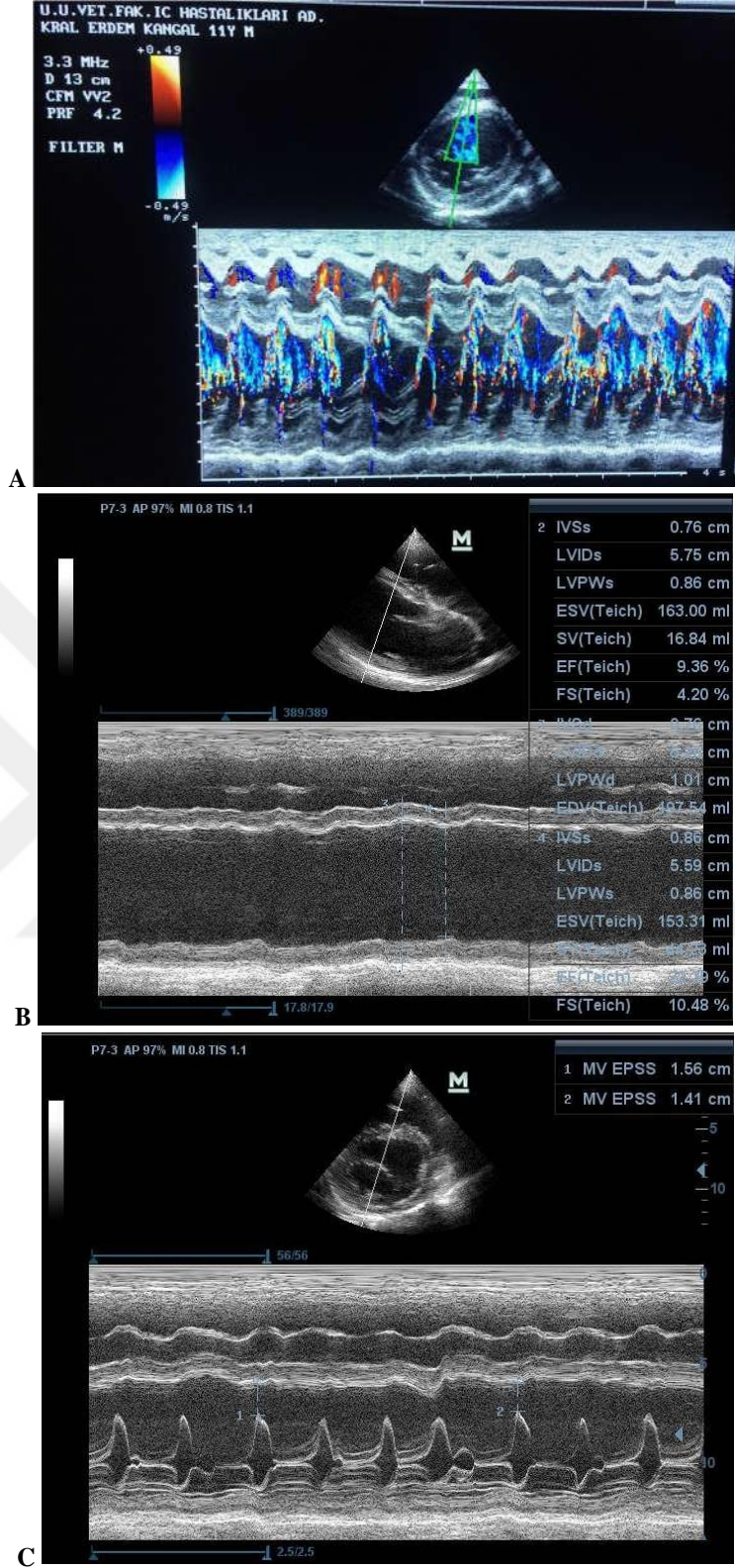
Vmax: maksimal velosite, ET: Ejeksiyon zamanı

**Tablo-24:** Kontrol ve test grubu olguların pulmoner arter (PA), aort (Ao), mitral kapak (MV) ve trikuspid kapak (TV) Doppler ölçümleri - median, minimum, maksimum ve %25- 75'lik dilimdeki ortalamalar

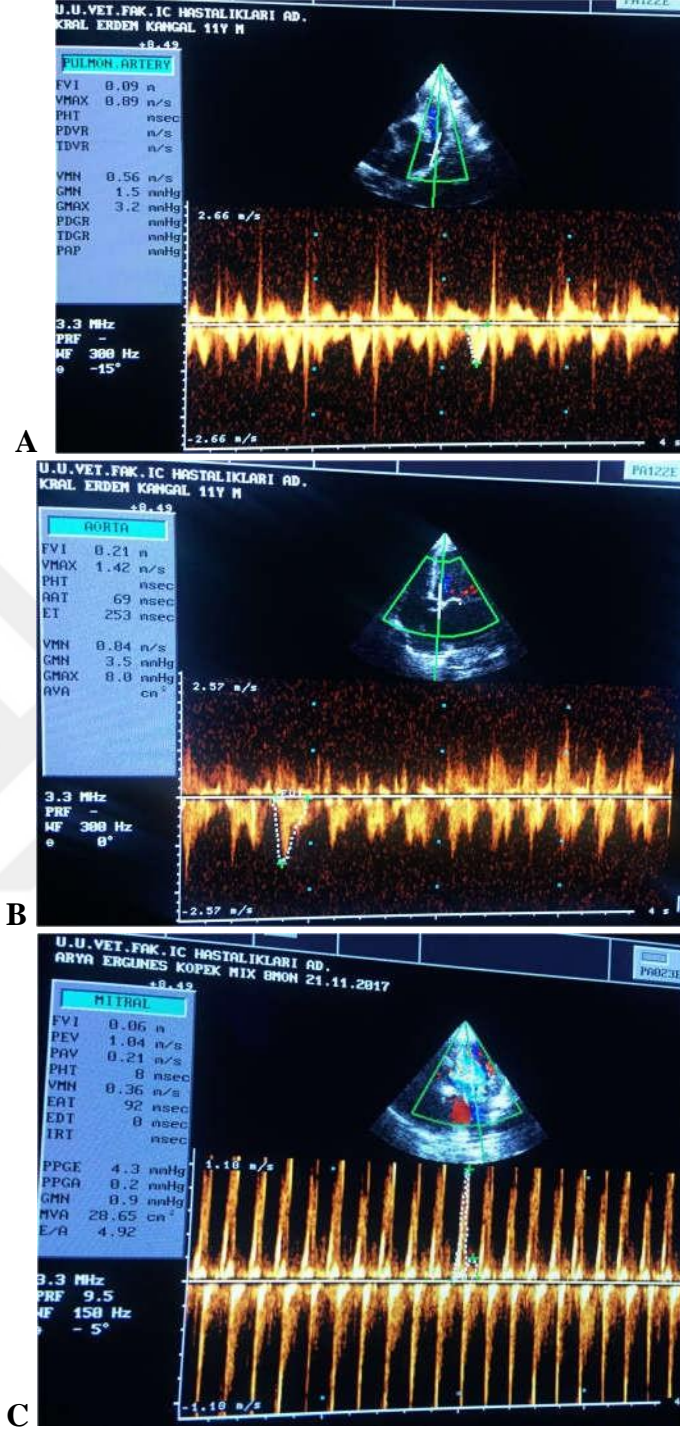
	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
PA Vmax mmHg	Kontrol	0,84	0,79	1,04	0,79	1,01
	Test	1,08	0,58	1,79	0,76	1,43
Ao Vmax mmHg	Kontrol	1,00	0,68	1,47	0,75	1,26
	Test	1,38	0,82	1,97	0,89	1,68
Ao-ET m/s	Kontrol	207	184	230	190	218
	Test	162	132	192	132	192
MV E/A	Kontrol	1,93	1,21	2,23	1,57	2,14
	Test	3,45	2,45	5,54	2,45	5,54
TV E/A	Kontrol	1,70	1,01	2,41	1,16	2,06
	Test	1,78	1,56	2,00	1,56	2,00



**Şekil-11:** Kalp yetmezliği tanımlanan olgularda A: sol atriyal dilatasyon, B: Mitral anterior kapakta kalınlaşma (endokardiyozis), C: Mitral kapak prolapsusu (MVP, sarı ok), D: aynı olguda MVP'na bağlı renkli Doppler ile regürgitan akım varlığı



**Şekil-12:** Kalp yetmezliğinde papillar kas kısa eksen görüntüde renkli Doppler ve M-mode muayenede sistol sırasında regürgitan akım varlığı (A), DCM'li bir olguda düzleşen interventriküler septum ve sol ventriküler serbest duvar – sistolik disfonksiyon göstergesi (B) ve DCM'ye bağlı yüksek EPSS değeri (C)



**Şekil-13:** Kalp yetmezliği olan hastalardan pulmonar arter (A) ve aort akım karakteristiklerinin ölçülmesi (B). A ve B kayıtları referans sınırlar içindeki tespitleri göstermektedir. C: Miksomatöz mitral kapak hastalığı (MMVD) olan bir köpekte mitral akım Doppler karakteristiği; restriktif yapıyı (E:A – 4,9) göstermekte.

**Tablo-25:** Kontrol ve test grubu olguların lökogram değerleri ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ); ortalama  $\pm$  standart hata

Parametre	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
WBC	13,08 $\pm$ 3,99	13,94 $\pm$ 5,12	0,681
Lenfosit	2,37 $\pm$ 0,99	1,97 $\pm$ 0,59	0,241
Nötrofil	9,42 $\pm$ 3,43	10,67 $\pm$ 5,13	0,529
Monosit	0,57 $\pm$ 0,34	0,70 $\pm$ 0,55	0,535
Eozinofil	0,53 $\pm$ 0,18	0,38 $\pm$ 0,31	0,204
Bazofil	0,16 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,06	0,001

WBC – total lökosit sayısı (white blood cell count)

**Tablo-26:** Kontrol (sağlıklı, n=10) ve test gruplarında (n=10) lökogram değerleri ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ); median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75	
WBC	Kontrol	11,26	9,02	18,51	9,48	18,46
	Test	12,40	7,25	21,99	10,07	19,16
Lenfosit	Kontrol	2,42	1,19	4,20	1,35	3,25
	Test	1,70	1,25	2,94	1,49	2,60
Nötrofil	Kontrol	7,20	6,18	15,5	7,02	13,13
	Test	8,90	5,55	19,49	6,15	15,60
Monosit	Kontrol	0,20	1,04	1,24	0,42	0,31
	Test	0,53	0,25	2,17	0,41	0,79
Ezinofil	Kontrol	0,49	0,20	0,87	0,46	0,68
	Test	0,36	0,03	1,13	0,10	0,52
Bazofil	Kontrol	0,16	0,10	0,28	0,14	0,18
	Test	0,04	0,02	0,19	0,02	0,12

WBC – total lökosit sayısı (white blood cell count)



**Tablo-27:** Kontrol ve test grubu olguların eritrogram değerleri; ortalama  $\pm$  standart hata

Parametre	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
RBC $\times 10^9/\mu\text{L}$	6,20 $\pm$ 0,41	6,28 $\pm$ 1,02	0,821
Hgb gr/dL	13,8 $\pm$ 1,3	14,2 $\pm$ 2,7	0,702
Hct %	41,3 $\pm$ 2,7	42,0 $\pm$ 7,8	0,810
MCV fl	66,6 $\pm$ 2,2	66,9 $\pm$ 6,4	0,881
MCH gr/dL	22,2 $\pm$ 1,1	22,4 $\pm$ 2,9	0,905
MCHC gr/dL	33,4 $\pm$ 1,4	33,8 $\pm$ 4,7	0,786
RDW %	17,3 $\pm$ 1,0	15,2 $\pm$ 5,4	0,237

RBC – eritrosit sayısı; Hgb – hemoglobin; Hct – hematokrit; MCV – ortalama RBC hacmi; MCH – ortalama RBC hemoglobini; MCHC – ortalama Hgb konsantrasyonu; ve RDW – RBC dağılım (şekil ve hacim) genişliği

**Tablo-28:** Kontrol (sağlıklı, n=10) ve test gruplarında (n=10) eritrogram değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

Gruplar		Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
RBC $\times 10^9/\mu\text{L}$	Kontrol	6,10	5,49	7,07	6,02	6,35
	Test	5,85	5,26	7,89	5,37	7,33
HGB gr/dL	Kontrol	13,7	11,6	16,2	13,3	14,5
	Test	13,4	9,8	18,6	12,2	17,1
HCT %	Kontrol	41,2	36,4	46,0	39,7	43,0
	Test	40,8	33,7	54,2	34,5	50,8
MCV fL	Kontrol	66,0	62,0	70,0	65,75	68,25
	Test	66,4	53,8	78,0	63,85	72,05
MCH gr/dL	Kontrol	22,3	20,2	24,4	21,6	22,8
	Test	22,7	16,6	26,4	20,8	24,6
MCHC gr/dL	Kontrol	33,9	31,0	35,1	32,1	34,5
	Test	35,1	24,8	39,5	30,6	36,9
RDW %	Kontrol	17,0	16,6	20,1	16,6	17,6
	Test	16,2	0,1	19,4	15,4	17,8

**Tablo-29:** Kontrol ve test grubu olguların trombogram değerleri; ortalama  $\pm$  standart hata

Parametre	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
Platelet sayısı $\times 10^3/\mu\text{L}$	346,70 $\pm$ 66,53	325,72 $\pm$ 158,47	0,704
PCT %	0,34 $\pm$ 0,05	2,03 $\pm$ 2,33	0,034
MPV fL	10,11 $\pm$ 1,62	9,88 $\pm$ 372	0,860
PDW %	39,54 $\pm$ 2,46	26,29 $\pm$ 12,76	0,005

PCT: Plateletkrit,

MPV: Ortalama platelet hacmi,

PDW: Platelet dağılım (hacimsel) genişliği

**Tablo-30:** Kontrol (sağlıklı, n=10) ve test gruplarında (n=10) trombogram değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

Gruplar		Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
Platelet $\times 10^3/\mu\text{L}$	Kontrol	358,00	212,00	417,00	314,50	396,75
	Test	331,50	49,20	551,00	204,25	461,75
PCT %	Kontrol	0,34	0,27	0,42	0,30	0,39
	Test	1,35	0,15	7,70	0,35	3,01
MPV fL	Kontrol	10,30	7,40	12,20	8,70	11,60
	Test	10,70	0,40	13,30	9,05	12,17
PDW %	Kontrol	39,90	34,80	44,30	37,80	40,45
	Test	19,90	15,00	44,20	15,50	41,32

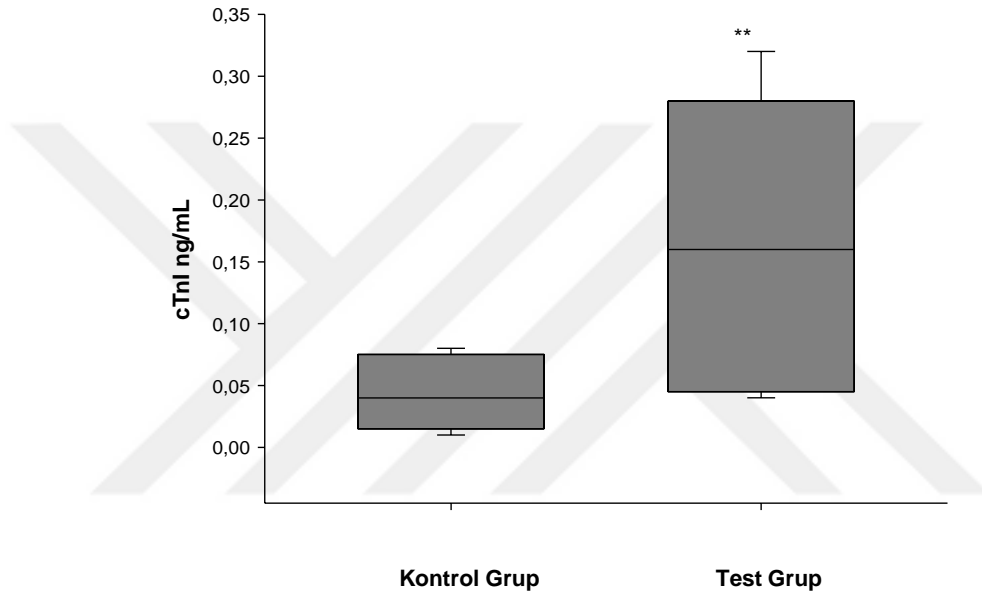
PCT: Plateletkrit,

MPV: Ortalama platelet hacmi,

PDW: Platelet dağılım (hacimsel) genişliği

**Tablo-31:** Kontrol ve test grubu olguların serum kardiyak troponin (cTnI) değerleri, ortalama  $\pm$  standart hata

Parametre	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
cTnI ng/mL	0,04 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,10	0,020



**Şekil-14:** Kontrol ve test gruplarına ait serum kardiyak troponin (cTnI) düzeyleri (\*\*P<0.01)

**Tablo-32:** Kontrol (sağlıklı, n=10) ve test gruplarında (n=10) serum kardiyak troponin I (cTnI) değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
cTnI ng/mL					
Kontrol	0,04	0,01	0,08	0,02	0,07
Test	0,16	0,04	0,32	0,05	0,24



**Tablo-33:** Kontrol ve test grubu olguların serum biyokimyasal değerleri, ortalama  $\pm$  standart hata

<b>Parametre</b>	<b>Kontrol n = 10</b>	<b>Test n = 10</b>	<b>P değeri</b>
<b>Albumin g/dL</b>	3,6 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,6	0,498
<b>ALP IU/L</b>	26,8 $\pm$ 8,6	95,3 $\pm$ 98,3	0,117
<b>ALT IU/L</b>	31,8 $\pm$ 7,5	94,3 $\pm$ 88,7	0,113
<b>Amilaz IU/L</b>	662 $\pm$ 161	514 $\pm$ 244	0,225
<b>Total Bilirubin mg/dL</b>	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,135
<b>BUN mg/dL</b>	14,6 $\pm$ 4,9	37,0 $\pm$ 52,4	0,322
<b>Kalsiyum mg/dL</b>	10,1 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 1,6	0,967
<b>Fosfor mg/dL</b>	4,5 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 2,4	0,240
<b>Kreatinin mg/dL</b>	0,7 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,6	0,321
<b>Glukoz mg/dL</b>	87 $\pm$ 8	109 $\pm$ 14	0,004
<b>Sodyum mmol/L</b>	140 $\pm$ 1	141 $\pm$ 6	0,585
<b>Potasyum mmol/L</b>	4,9 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,5	0,951
<b>Total Protein g/dL</b>	6,4 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 1,1	0,823
<b>Globulin g/dL</b>	2,8 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 1,0	0,950

**Tablo-34:** Kontrol (sağlıklı, n=10) ve test gruplarında (n=10) serum biyokimyasal değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
<b>Albumin</b> g/dL	Kontrol	3,7	3,3	3,9	3,4	3,8
	Test	3,4	2,3	4,5	3,0	4,0
<b>ALP</b> IU/L	Kontrol	26,5	17,0	41,0	18,5	33,5
	Test	44,0	9,0	294,0	30,5	173,5
<b>ALT</b> IU/L	Kontrol	30,5	24,0	43,0	24,7	39,2
	Test	67,0	30,0	305,0	35,5	128,0
<b>Amilaz</b> IU/L	Kontrol	708,	422	829	491	801
	Test	486	250	1050	331	575
<b>T.B.</b> mg/dL	Kontrol	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3
	Test	0,3	0,2	0,5	0,3	0,3
<b>BUN</b> mg/dL	Kontrol	13,5	8,0	21,0	11,0	20,2
	Test	17,5	9,0	165,0	11,0	33,2
<b>Kalsiyum</b> mg/dL	Kontrol	10,2	9,7	10,7	9,7	10,5
	Test	10,6	6,2	11,3	10,0	11,1
<b>Fosfor</b> mg/dL	Kontrol	4,5	3,9	5,2	4,0	5,0
	Test	4,5	4,0	10,5	4,2	8,0
<b>Kreatinin</b> mg/dL	Kontrol	0,8	0,4	1,0	0,5	1,0
	Test	0,9	0,6	2,8	0,7	1,0
<b>Glukoz</b> mg/dL	Kontrol	87	78	100	79	93
	Test	104	95	133	98	122
<b>Sodyum</b> mmol/L	Kontrol	147	142	152	143	146
	Test	145	130	148	137	146
<b>Potasyum</b> mmol/L	Kontrol	5,0	4,5	5,4	4,7	5,1
	Test	4,9	4,0	5,8	4,5	5,4
<b>T. P.</b> g/dL	Kontrol	6,4	6,2	6,9	6,2	6,7
	Test	6,4	4,7	7,8	5,2	7,4
<b>Globulin</b> g/dL	Kontrol	2,8	2,4	3,4	2,4	3,3
	Test	3,0	1,5	4,3	1,7	3,9

T.B. – total bilirubin; T.P. – total protein

**Tablo-35:** Kontrol ve test grubu olguların serum total tiroksin (T4) ve kolesterol değerleri (ortalama  $\pm$  standart hata)

Parametre	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
T4 $\mu\text{g/dL}$	3,40 $\pm$ 0,46	2,16 $\pm$ 1,32	0,059
Kolesterol mg/dL	202 $\pm$ 47	240 $\pm$ 29	0,161

**Tablo-36:** Kontrol (sağlıklı, n=10) ve test gruplarında (n=10) serum tiroksin (T4) ve kolesterol değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
T4 $\mu\text{g/dL}$	Kontrol	3,6	2,6	3,8	2,9	3,7
	Test	2,7	1,3	3,6	1,4	3,3
Kolesterol mg/dL	Kontrol	196	157	280	158	239
	Test	240	194	270	214	266

**Tablo-37:** Kontrol ve test grubu olguların protrombin (PT) ve aktive parsiyal tromboplastin zamanları (aPTT) - ortalama  $\pm$  standart hata

Parametre	Kontrol, n = 10	Test, n = 10	P değeri
PT sn	16,4 $\pm$ 0,4	19,0 $\pm$ 0,9	0,001
aPTT sn	92,4 $\pm$ 4,8	146,2 $\pm$ 77,4	0,085

**Tablo-38:** Kontrol ve test grubu olguların protrombin (PT) ve aktive parsiyal tromboplastin zamanları (aPTT); median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
PT sn	Kontrol	16,5	15,9	17,2	16,0	16,8
	Test	19,0	18,4	19,7	18,4	19,7
aPTT sn	Kontrol	91,7	86,9	99,9	88,1	97,1
	Test	146,2	91,5	201,0	91,5	201,0

**Tablo-39:** Kontrol ve test grubu olguların tromboelastografik (TEG) muayene sonuçları - ortalama  $\pm$  standart hata

<b>Parametre</b>	<b>Kontrol</b> n = 10	<b>Test</b> n = 10	<b>P değeri</b>
<b>R süresi dk</b>	2,2 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 1,0	0,098
<b>K süresi dk</b>	2,6 $\pm$ 1,5	4,0 $\pm$ 2,1	0,346
<b>Alfa açısı derece</b>	59,1 $\pm$ 12,4	49,0 $\pm$ 11,5	0,281
<b>MA mm</b>	43,9 $\pm$ 7,4	42,2 $\pm$ 9,4	0,764
<b>PMA mm</b>	0,3 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,5	1,000
<b>G d/dk</b>	4,0 $\pm$ 1,1	3,8 $\pm$ 1,6	0,823
<b>EPL %</b>	2,7 $\pm$ 4,8	13,3 $\pm$ 23,1	0,287
<b>A mm</b>	44,1 $\pm$ 6,3	33,8 $\pm$ 23,3	0,318
<b>CI</b>	-0,7 $\pm$ 2,8	-2,7 $\pm$ 2,8	0,355
<b>LY30 %</b>	2,7 $\pm$ 4,8	13,3 $\pm$ 23,1	0,287

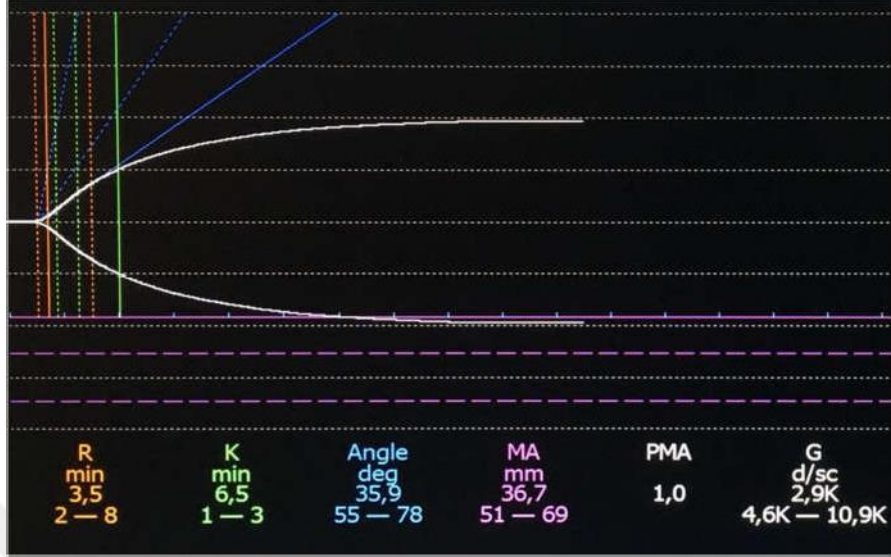
Pıhtı oluşumu ile ilgili TEG parametreleri: R – reaksiyon süresi; K – pıhtılaşma süre; MA – maksimum amplitüd; PMA – MA minimal normal sınırlara geldiğinde; G – MA'nın logaritmik derivasyonu ve pıhtı sağlamlığı; EPL – lizisin 30 dakikada gerçekleşme oranı; A – 30 dakikada ki amplitüd; CI – koagülasyon indeksi; ve LY30 – 30 dakikadaki lizis

**Tablo-40:** Kontrol ve test grubu olguların tromboelastografik (TEG) muayene sonuçları; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

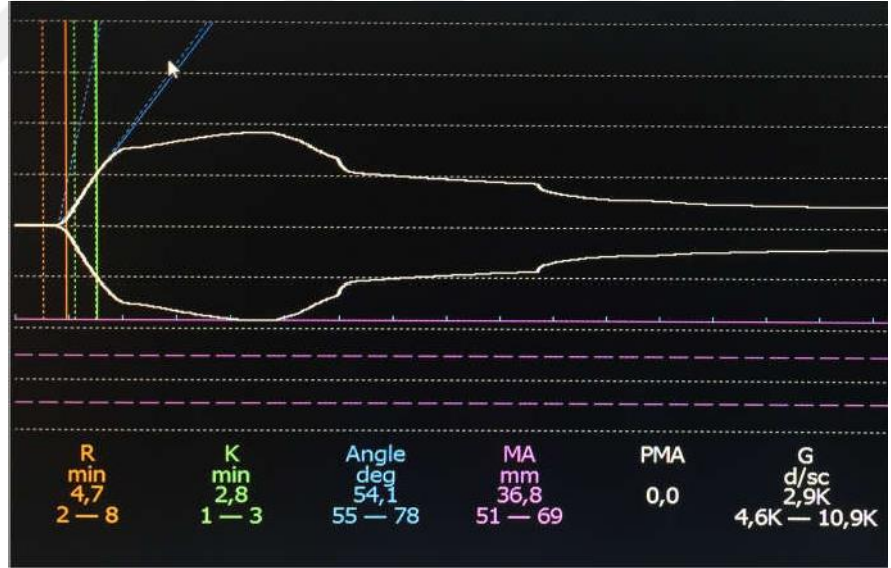
	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
<b>R süresi</b> dk	Kontrol	2,1	1,2	4,1	1,3	2,9
	Test	3,5	2,7	4,7	2,7	4,7
<b>K süresi</b> dk	Kontrol	2,1	0,8	4,5	1,3	4,3
	Test	2,8	2,7	6,5	2,7	6,5
<b>Alfa açısı</b> derece	Kontrol	57,2	42,1	80,4	52,2	66,6
	Test	54,1	35,9	57,2	35,9	57,2
<b>MA</b> mm	Kontrol	44,8	31,8	53,8	38,1	49,6
	Test	36,8	36,7	53,1	36,7	53,1
<b>PMA</b> mm	Kontrol	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0
	Test	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0
<b>G</b> d/dk	Kontrol	4,0	4,0	5,8	3,1	4,9
	Test	2,9	2,9	5,7	2,9	5,7
<b>EPL</b> %	Kontrol	0,0	0,0	12,0	0,0	6,3
	Test	0,0	0,0	40,1	0,0	40,1
<b>A</b> mm	Kontrol	44,3	44,3	54,7	38,2	48,4
	Test	38,8	38,8	54,3	8,4	54,3
<b>CI</b>	Kontrol	-0,7	-4,0	3,8	-3,4	1,1
	Test	-3,3	-5,3	0,3	-5,3	0,3
<b>LY30</b> %	Kontrol	0,0	0,0	12,0	0,0	6,3
	Test	0,0	0,0	40,1	0,0	40,1

Pıhtı oluşumu ile ilgili TEG parametreleri: R – reaksiyon süresi; K – pıhtılaşma süre; MA – maksimum amplitüd; PMA – MA minimal normal sınırlara geldiğinde; G – MA'nın logaritmik derivasyonu ve pıhtı sağlamlığı; EPL – lizis 30 dakikada gerçekleşme oranı; A – 30 dakikada ki amplitüd; CI – koagülasyon indeksi; ve LY30 – 30 dakikadaki lizis

A



B



**Şekil-15:** DCM'li (A) ve CVHD'li (B) olgularda tromboelastografik (TEG) değerlendirme – platelet mapping. A: Hipokoagülasyon, B: sekonder fibrinolizis ile uyumludur.

**Tablo-41:** Kontrol ve test grubu olguların tromboelastografik (TEG) velosite curve verileri (TEG V-curve) - ortalama  $\pm$  standart hata

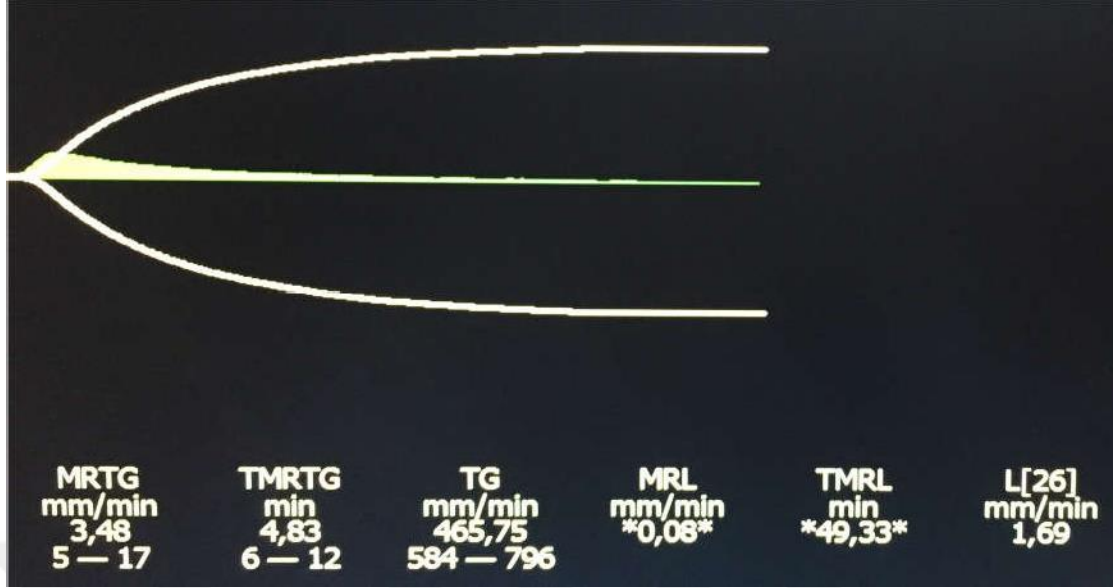
Parametre	Kontrol n = 10	Test n = 10	P değeri
MRTG mm/dk	11,1 $\pm$ 8,1	7,0 $\pm$ 0,4	0,523
TMRTG dk	3,04 $\pm$ 1,43	5,0 $\pm$ 1,7	0,07
TG mm/dk	550 $\pm$ 70	548 $\pm$ 154	0,987
MRL mm/dk	0,8 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,1	0,002
TMRL dk	20,9 $\pm$ 4,7	30,6 $\pm$ 0,5	0,05
L dk	47 $\pm$ 34	281 $\pm$ 83	0,03

MRTG: Trombus oluşumunun maksimum oranı; TMRTG: MRTG için geçen süre; TG: Total trombus oluşumu; MRL: Maksimum lizis oranı; TMRL: MRL için geçen süre; ve L: total lizis süresi

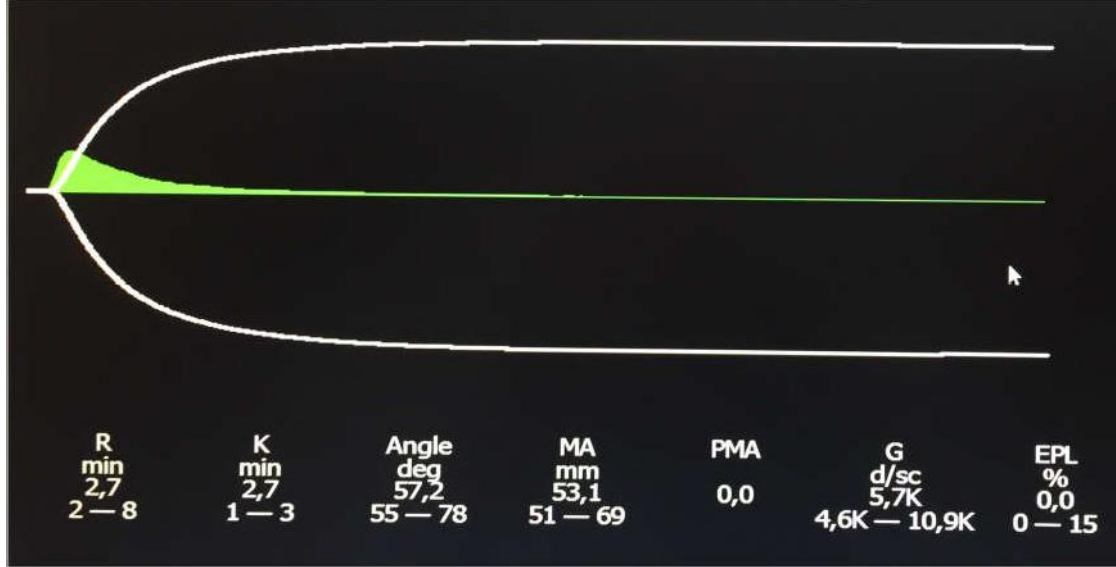
**Tablo-42:** Kontrol ve test grubu olguların tromboelastografik (TEG) velosite curve verileri (TEG V-curve); median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar

	Gruplar	Median	Minimum	Maksimum	%25	%75
MRTG mm/dk	Kontrol	8,8	4,9	27,1	5,9	14,9
	Test	7,0	6,7	7,4	6,7	7,4
TMRTG dk	Kontrol	2,8	1,7	5,6	1,8	3,9
	Test	5,0	3,8	6,3	3,8	6,3
TG mm/dk	Kontrol	547	438	657	510	597
	Test	548	439	658	439	658
MRL mm/dk	Kontrol	0,8	0,6	1,1	0,6	1,1
	Test	5,3	5,2	5,5	5,2	5,5
TMRL dk	Kontrol	20,9	17,5	24,3	17,5	24,3
	Test	30,6	30,2	31,0	30,2	31,0
L Dk	Kontrol	47	23	71	23	71
	Test	281	222	340	222	340

A



B



Şekil-16: DCM'li (A) ve CVHD'li (B) olgularda TEG Velosite Curve profilleri.

A: Cane corso (PT 19,7 sn; referans: 14 – 19 sn ve aPTT: >200 sn; referans: 75-105 sn)

B: Cocker Spaniel; V-curve dataları - MRTG: 7,16 mm/min; TMRTG: 3,83 min; TG: 658,13 mm/min



**Tablo-43:** Platelet sayısı (PLT) ve indekslerinin (PCT, MPV ve PDW) TEG ve V-curve verileri ile korelasyonları. Korelasyon etkisi (*r*) ve P değerleri

		<b>R</b>	<b>K</b>	<b>Alfa açısı</b>	<b>MA</b>	<b>MRTG</b>	<b>TMRTG</b>	<b>TG</b>
<b>PLT</b>	<i>r</i>	0,276	-0,678	0,322	0,580	0,338	0,306	0,567
	P	0,597	0,139	0,533	0,227	0,513	0,556	0,241
<b>PCT</b>	<i>r</i>	-0,00859	-0,560	0,562	0,640	0,691	0,0562	0,728
	P	0,987	0,248	0,246	0,171	0,128	0,916	0,101
<b>MPV</b>	<i>r</i>	-0,488	0,540	0,124	-0,304	0,202	-0,468	-0,198
	P	0,327	0,268	0,815	0,558	0,702	0,350	0,707
<b>PDW</b>	<i>r</i>	-0,475	0,832	-0,111	-0,716	-0,201	-0,512	-0,587
	P	0,342	0,0398	0,835	0,109	0,702	0,300	0,220
<b>R</b>	<i>r</i>		-0,0752	-0,776	0,0634	-0,573	0,995	-0,0537
	P		0,887	0,0697	0,905	0,234	0,00004	0,920
<b>K</b>	<i>r</i>			-0,478	-0,954	-0,616	-0,140	-0,897
	P			0,338	0,003	0,193	0,791	0,0153
<b>Alfa-açısı</b>	<i>r</i>				0,493	0,915	-0,726	0,578
	P				0,320	0,0106	0,103	0,229
<b>MA</b>	<i>r</i>					0,721	0,148	0,965
	P					0,106	0,780	0,00182
<b>MRTG</b>	<i>r</i>						-0,493	0,798
	P						0,320	0,0573
<b>TMRTG</b>	<i>r</i>							0,0286
	P							0,957
<b>TG</b>								*

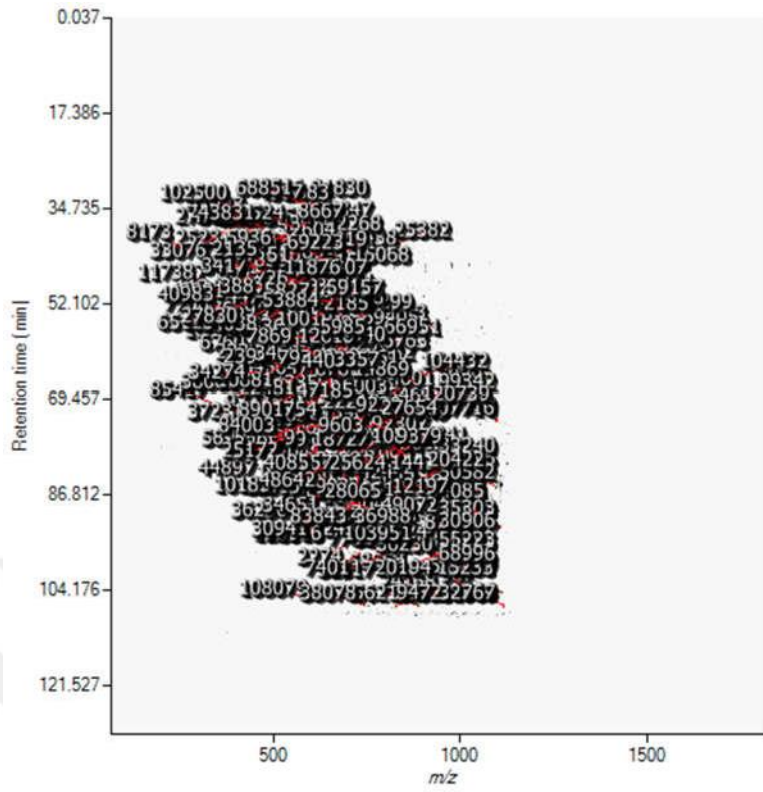
R – reaksiyon zamanı; K – kinetik süre; MA – maksimum amplitüd; MRTG – maksimum trombin oluşumu; TMRTG – MRTG için geçen süre; TG – trombin oluşumu

**Tablo-44:** Kontrol (n=10) ve test grubunda (n=10) platelet izolatlarında ortak olarak bulunan tüm proteinler (107 adet). Kontrole göre en az 1.2 kat değişim (power >0.57) gösteren ilk 10 protein istatistiksel önemde farklı görülmüştür.

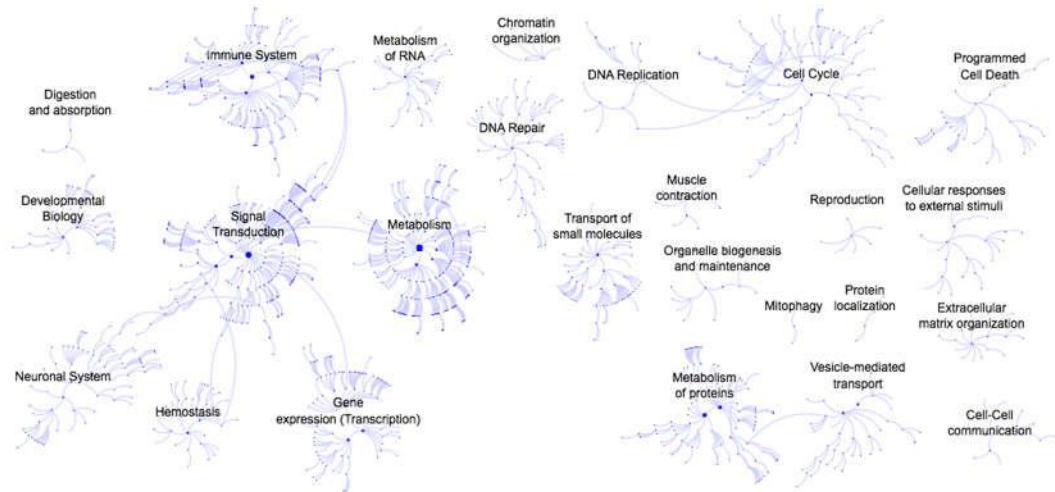
No	Değişim	Protein tanımlama
P12279	2,0	Apolipoprotein C-III
Q4LAL9	1,4	Cathepsin D
E2RAK7	1,9	Apolipoprotein A-II
P67780	1,4	Cytochrome c oxidase subunit 2
Q5KSV9	2,8	C-X-C motif chemokine 10
P52206	2,0	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (Fragment)
Q8MJ46	1,2	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic sub.
P25473	1,8	Clusterin
Q863Z4	1,2	Myotrophin
P05124	1,2	Creatine kinase B-type
P41148	1,1	Endoplasmic
P50551	1,1	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
O46674	1,2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
Q8MJ47	1,3	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit
P60524	1,8	Hemoglobin subunit beta
P81709	4,4	Lysozyme C-spleen isozyme
P24409	1,5	Ras-related protein Rab-10
P49822	3,2	Serum albumin
Q8HZR1	1,8	Prostaglandin G/H synthase 1
Q28279	1,2	cGMP-gated cation channel alpha-1
O97564	1,7	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) gamma-T2
P19006	1,5	Haptoglobin
P33703	1,9	Beta-2-glycoprotein 1
P02677	1,5	Fibrinogen beta chain (Fragment)
P18649	1,4	Apolipoprotein E
P02648	2,1	Apolipoprotein A-I
P81546	1,2	Metalloproteinase inhibitor 1
F1PTE3	2,3	Ras-related protein Rab-13
P62999	1,1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
O97555	1,2	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
P56595	1,6	Apolipoprotein C-I
P60467	1,4	Protein transport protein Sec61 subunit beta

<b>O18733</b>	2,9	Matrix metalloproteinase-9
<b>P54831</b>	1,1	Transforming growth factor beta-1
<b>P18067</b>	1,1	Ras-related protein Rab-7a
<b>Q28259</b>	1,2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>Q1HE58</b>	1,2	Ras-related protein Rab-27A
<b>Q863A2</b>	1,2	T-box transcription factor TBX2
<b>P51152</b>	1,1	Ras-related protein Rab-12 (Fragment)
<b>F1PCT7</b>	1,5	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 2
<b>O18840</b>	1,1	Actin cytoplasmic 1
<b>P62822</b>	1,2	Ras-related protein Rab-1A
<b>P60529</b>	1,3	Hemoglobin subunit alpha
<b>P63050</b>	1,1	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
<b>P80009</b>	1,1	Plasminogen (Fragment)
<b>Q0X0E5</b>	1,1	NADH-cytochrome b5 reductase 3
<b>P38400</b>	1,0	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
<b>Q8WMS6</b>	1,0	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit
<b>P63091</b>	1,2	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha
<b>Q7YQC6</b>	1,1	Heat shock 70 kDa protein 1
<b>P79147</b>	1,3	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3
<b>Q28275</b>	1,1	Fibronectin (Fragment)
<b>P83362</b>	1,2	Signal peptidase complex subunit 1 (Fragments)
<b>P24406</b>	1,1	Transforming protein RhoA
<b>Q50KA9</b>	1,1	Nucleoside diphosphate kinase A
<b>O97492</b>	1,0	Catalase
<b>P61162</b>	1,1	Alpha-centractin
<b>P01784</b>	1,1	Ig heavy chain V region GOM
<b>P49820</b>	1,3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 (Fragment)
<b>P61007</b>	1,2	Ras-related protein Rab-8A
<b>P47842</b>	1,7	Solute carrier family 2_ facilitated glucose transporter member 3
<b>P01874</b>	1,1	Ig chain C region
<b>P00011</b>	1,1	Cytochrome C
<b>P12278</b>	19,7	Apolipoprotein C-II
<b>P28490</b>	1,3	Calreticulin (Fragment)
<b>Q9XSR0</b>	1,0	Interleukin-18
<b>Q3YIX4</b>	1,1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1

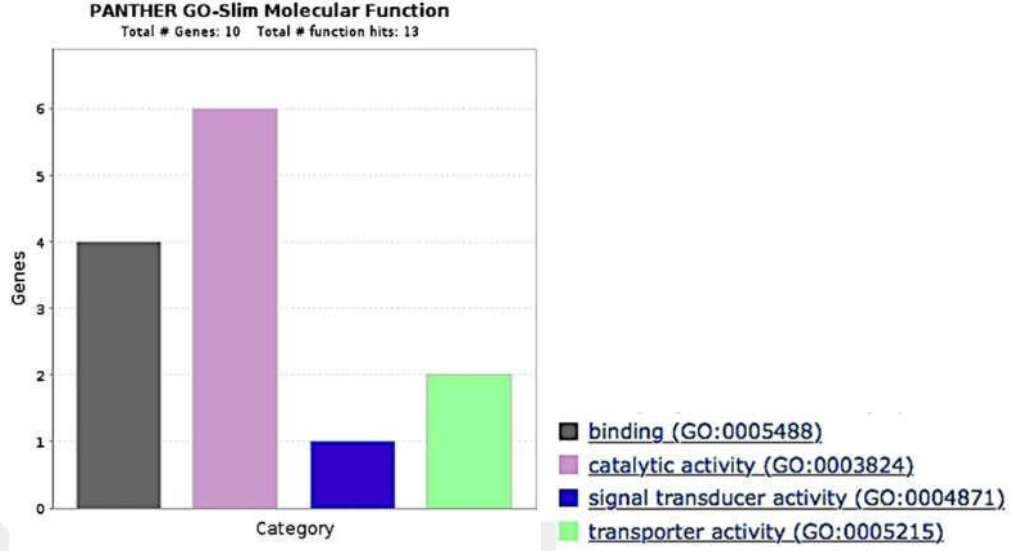
<b>P86218</b>	1,1	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC
<b>Q28284</b>	1,9	CD44 antigen (Fragment)
<b>Q50KA8</b>	1,1	Nucleoside diphosphate kinase B
<b>Q9TQX6</b>	1,0	Acyl-CoA-binding protein
<b>A0M8V0</b>	1,0	F-actin-capping protein subunit alpha-2
<b>P24643</b>	1,0	Calnexin
<b>P62490</b>	1,0	Ras-related protein Rab-11A
<b>Q9GL23</b>	1,1	Apoptotic protease-activating factor 1 (Fragment)
<b>P18466</b>	1,1	DLA class I histocompatibility antigen_ A9/A9 alpha chain
<b>Q6TEQ7</b>	1,1	Annexin A2
<b>E2RQ15</b>	1,0	Ras-related protein Rab-25
<b>P62872</b>	1,0	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
<b>P60952</b>	1,0	Cell division control protein 42 homolog
<b>Q28256</b>	1,2	Platelet glycoprotein Ib alpha chain
<b>P68213</b>	1,1	Fibrinogen alpha chain (Fragment)
<b>Q28294</b>	1,0	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha
<b>Q28300</b>	1,0	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1
<b>Q8MJ44</b>	1,0	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha
<b>Q95168</b>	1,0	Tight junction protein ZO-2
<b>E2RQ08</b>	1,0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 1
<b>P49256</b>	1,0	Vesicular integral-membrane protein VIP36
<b>E2RE76</b>	1,0	Apolipoprotein A-IV
<b>P19341</b>	1,2	Beta-2-microglobulin (Fragment)
<b>Q28923</b>	1,0	Tyrosine-protein kinase Yes
<b>P33710</b>	1,0	Galanin peptides (Fragment)
<b>Q29536</b>	1,0	Pyruvate kinase PKLR
<b>Q258K2</b>	1,0	Myosin-9
<b>P01785</b>	1,0	Ig heavy chain V region MOO
<b>Q28250</b>	1,0	Signal peptidase complex subunit 2
<b>P51147</b>	1,0	Ras-related protein Rab-5C
<b>Q6Q308</b>	1,0	Pleckstrin
<b>P54714</b>	1,0	Triosephosphate isomerase
<b>Q8WNN6</b>	1,0	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
<b>P62825</b>	1,0	GTP-binding nuclear protein Ran
<b>P61017</b>	1,0	Ras-related protein Rab-4B
<b>O97556</b>	1,0	Rab GDP dissociation inhibitor beta
<b>Q28288</b>	1,0	Syntaxin-binding protein 2



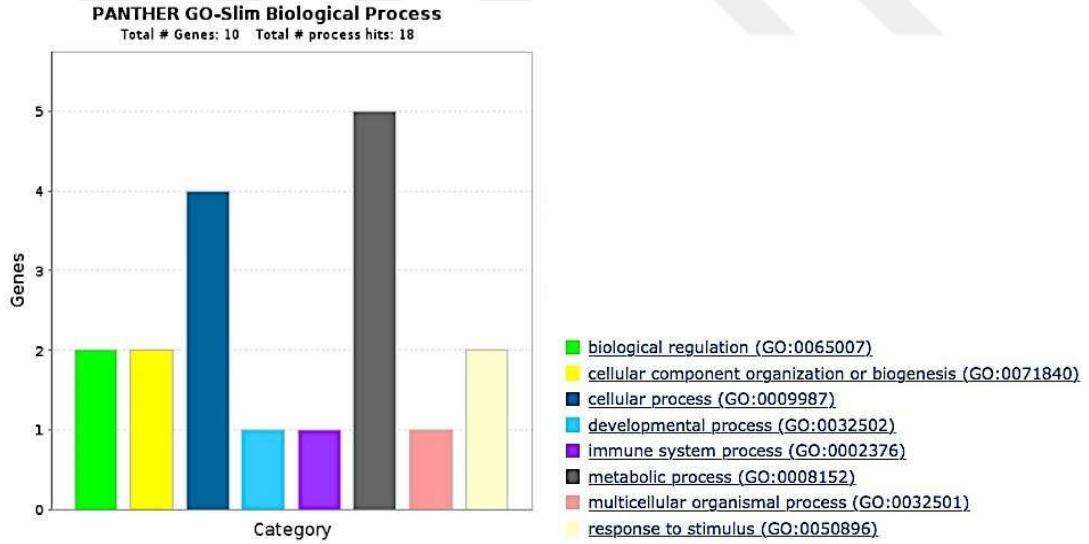
**Şekil-17:** Bu çalışmada izole edilen platelet proteomlarının *Canis lupus familiaris* (evcil köpek) protein veri tabanına göre tanımlanması (accession numaraları) ve reaksiyon süresi ve kütle/yük oranlarına (m/z) göre genel dağılımları



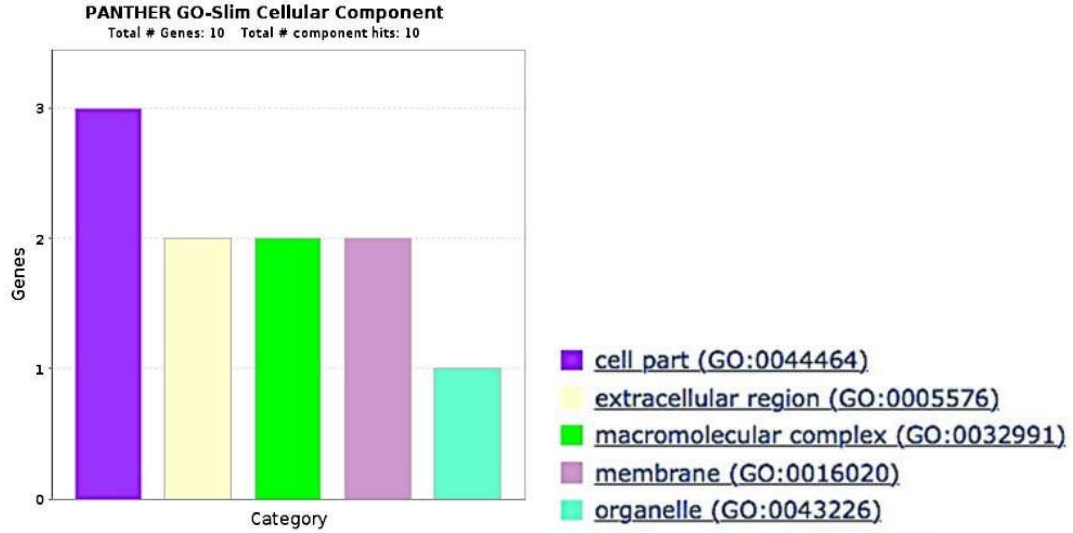
**Şekil-18:** Platelet proteomlarının moleküler - biyolojik fonksiyonları ve birbirleri ile bağlantıları (reocome analizi)



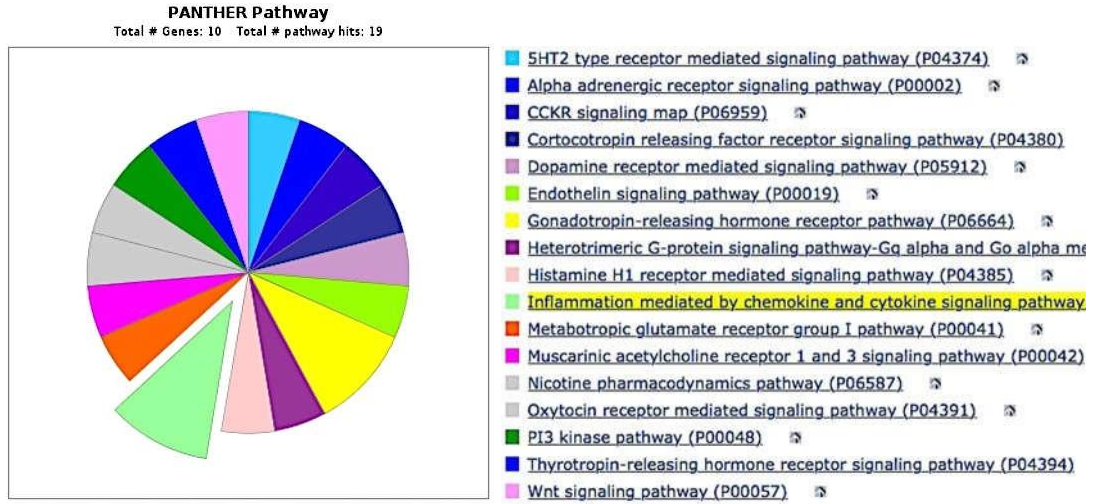
**Şekil-19:** Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının (n=10) moleküler fonksiyonları ve dağılımları



**Şekil-20:** Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının (n=10) biyolojik fonksiyonları ve dağılımları

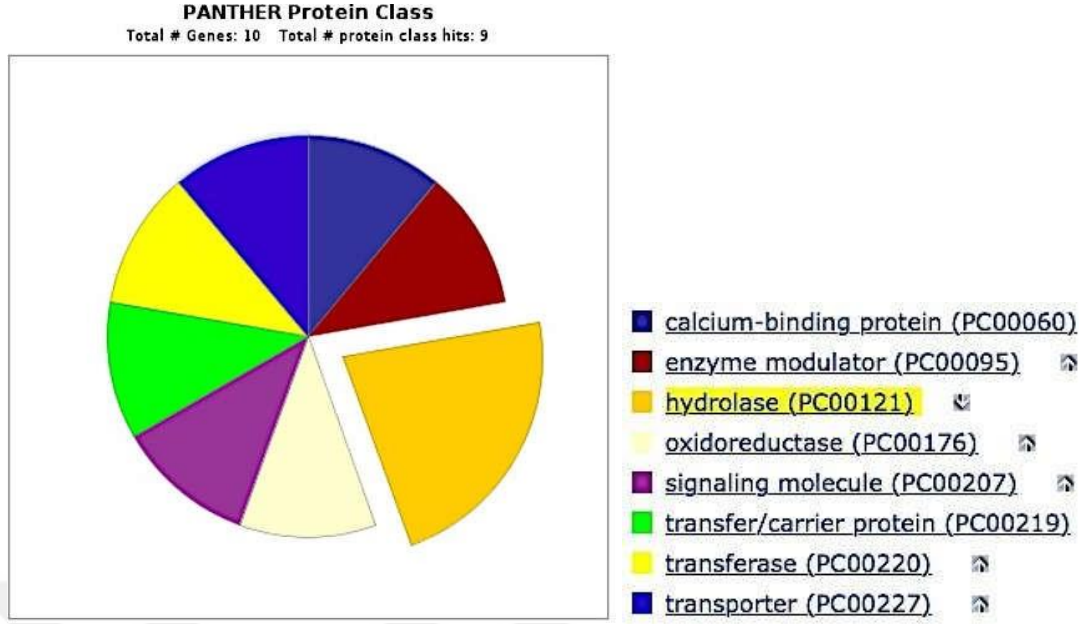


**Şekil-21:** Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının (n=10) sellüler yapılarıdaki dağılımları



**Şekil-22:** Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının (n=10) yolak (pathway) analizi; kemokin ve sitokin aracılı inflamasyon yolağı (sarı renk) ve gonadotropin-releasing hormon aracılı yollak (açık yeşil) öncelikli görevler arasında görülmektedir.



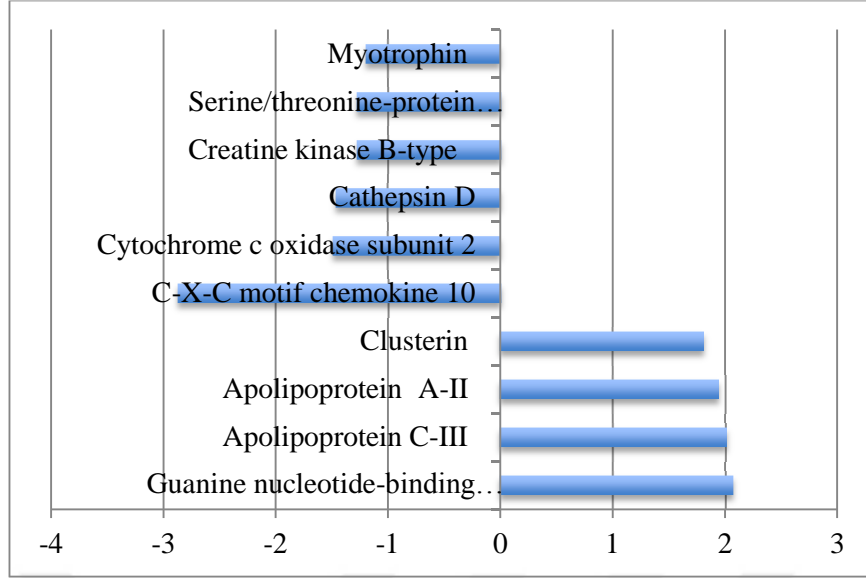


**Şekil-23:** Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının (n=10) protein sınıfları; hidrolaz (hardal renk), transferaz (sarı) ve transfer/taşıyıcı proteinler (yeşil) öncelikli görülmektedir.

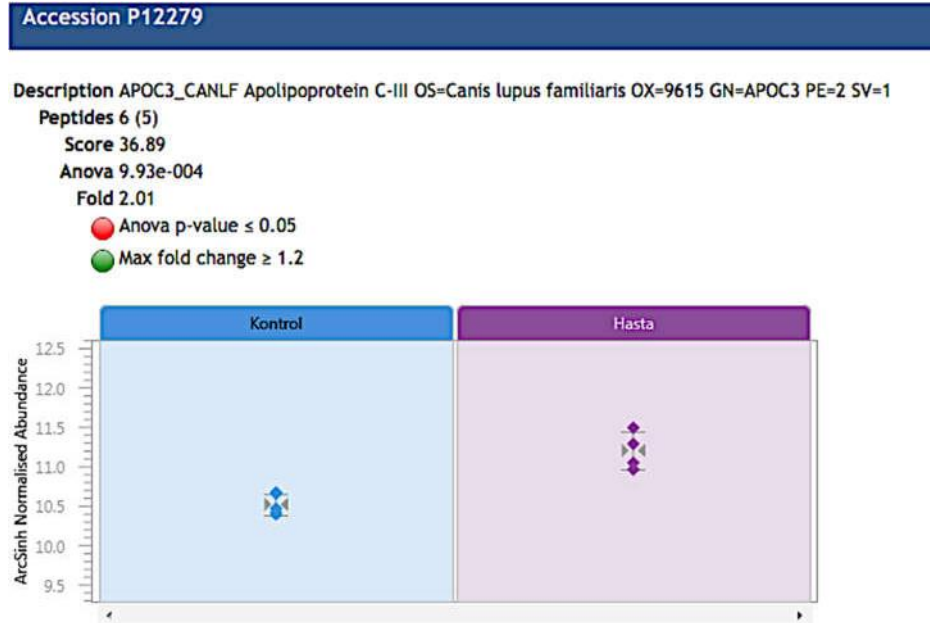
**Tablo-45:** Kontrol ve hasta (test) gruplarında ortak olan ancak istatistiksel düzeyde farklılık gösteren platelet proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları (Anova  $P < 0,05$  ve değişim oranı  $> 1,2$ )

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Tags	Description	Average Normalised Abundances	
							Kontrol	Hasta
P25473	68 (59)	434.85	0.03	1.81	●	CLUS_CANLF Clusterin OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=CLU PE=2 SV=1	3.11e+005	5.63e+005
P05124	51 (45)	380.59	0.04	1.28	●	KCRB_CANLF Creatine kinase B-type OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=CKB PE=1 SV=1	4.61e+005	3.60e+005
Q863Z4	19 (16)	132.02	0.04	1.20	●	MTPN_CANLF Myotrophin OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=MTPN PE=3 SV=3	5.50e+004	4.59e+004
PS2206	19 (10)	115.78	0.02	2.07	●	GNA11_CANLF Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (Fragment) OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=GNA11 PE=2 SV=1	3.91e+004	8.10e+004
E2RAK7	16 (14)	97.71	7.32e-003	1.94	●	APOA2_CANLF Apolipoprotein A-II OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=APOA2 PE=1 SV=2	2.36e+004	4.58e+004
Q8MJ46	13 (6)	83.60	0.03	1.24	●	PP1G_CANLF Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=PPP1CC PE=2 SV=1	1.07e+005	8.60e+004
P67780	6 (5)	48.36	0.02	1.49	●	COX2_CANLF Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=MT-CO2 PE=3 SV=1	2.54e+004	1.70e+004
P12279	6 (5)	36.89	9.93e-004	2.01	●	APOC3_CANLF Apolipoprotein C-III OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=APOC3 PE=2 SV=1	1.87e+004	3.75e+004
Q4LAL9	6 (6)	32.94	2.13e-003	1.46	●	CATD_CANLF Cathepsin D OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=CTSD PE=2 SV=1	2.96e+004	2.03e+004
Q5KSV9	1 (1)	5.36	0.02	2.87	●	CXL10_CANLF C-X-C motif chemokine 10 OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=CXL10 PE=3 SV=1	1.14e+004	3969.08





Şekil-24: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında test (hasta) grubunda artan (sağ sütün; n=4) ve azalan (sol sütün; n=6) proteinler.



Şekil-25: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet apolipoprotein C-III düzeyindeki değişim

#### Accession E2RAK7

Description APOA2\_CANLF Apolipoprotein A-II OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=APOA2 PE=1 SV=2

Peptides 16 (14)

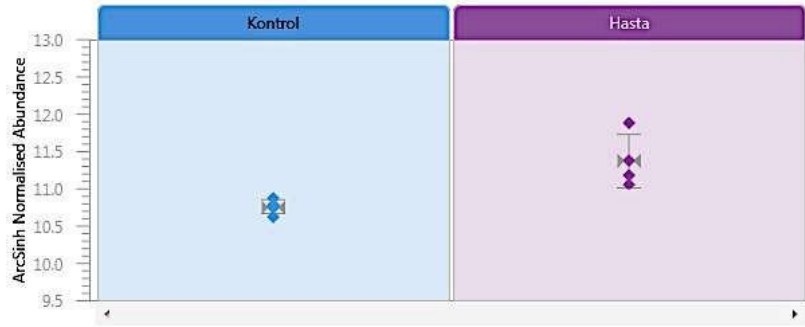
Score 97.71

Anova 7.32e-003

Fold 1.94

● Anova p-value  $\leq 0.05$

● Max fold change  $\geq 1.2$



Şekil-26: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet apolipoprotein A-II düzeyindeki değişim

#### Accession P52206

Description GNA11\_CANLF Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (Fragment) OS=Canis lupus

Peptides 19 (10)

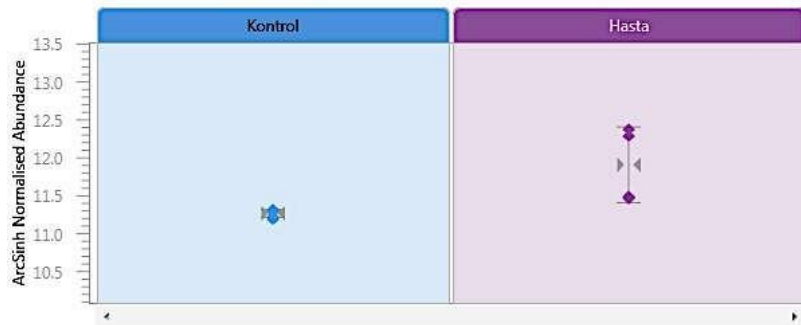
Score 115.78

Anova 0.02

Fold 2.07

● Anova p-value  $\leq 0.05$

● Max fold change  $\geq 1.2$



Şekil-27: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet guanine nucleotid-binding protein düzeyindeki değişim

### Accession P25473

Description CLUS\_CANLF Clusterin OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=CLU PE=2 SV=1

Peptides 68 (59)

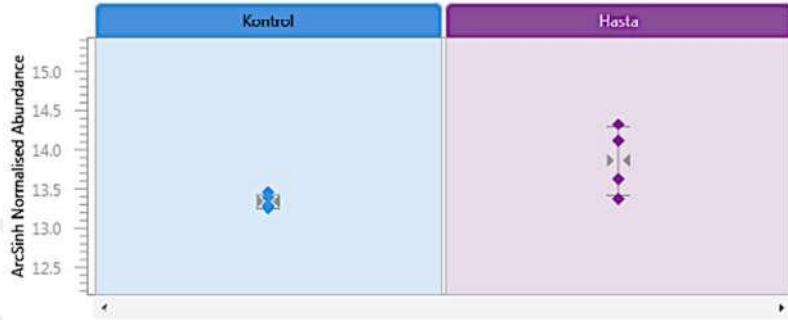
Score 434.85

Anova 0.03

Fold 1.81

● Anova p-value  $\leq 0.05$

● Max fold change  $\geq 1.2$



Şekil-28: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet clusterin düzeyindeki değişim

### Accession Q4LAL9

Description CATD\_CANLF Cathepsin D OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=CTSD PE=2 SV=1

Peptides 6 (6)

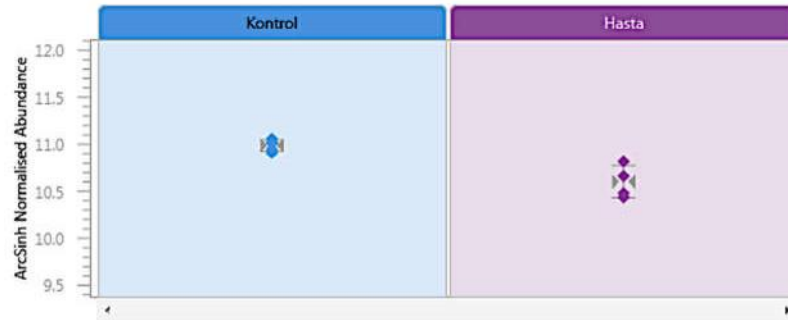
Score 32.94

Anova 2.13e-003

Fold 1.46

● Anova p-value  $\leq 0.05$

● Max fold change  $\geq 1.2$



Şekil-29: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet cathepsin düzeyindeki değişim

Accession P67780

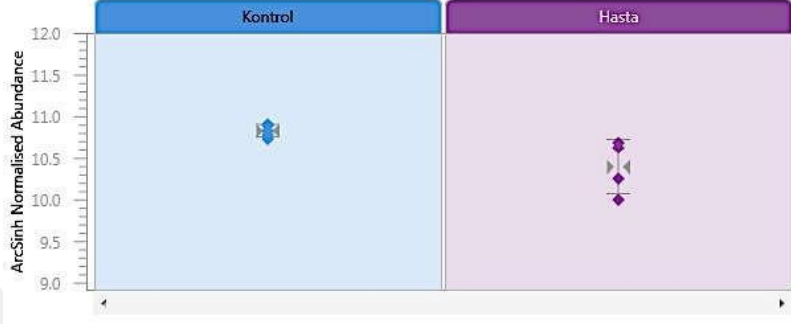
Description COX2\_CANLF Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=MT-CO2 PE=Peptides 6 (5)

Score 48.36

Anova 0.02

Fold 1.49

- Anova p-value  $\leq 0.05$
- Max fold change  $\geq 1.2$



Şekil-30: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet cytochrome oxidase düzeyindeki değişim

Accession Q5KSV9

Description CXL10\_CANLF C-X-C motif chemokine 10 OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=CXCL10 PE=

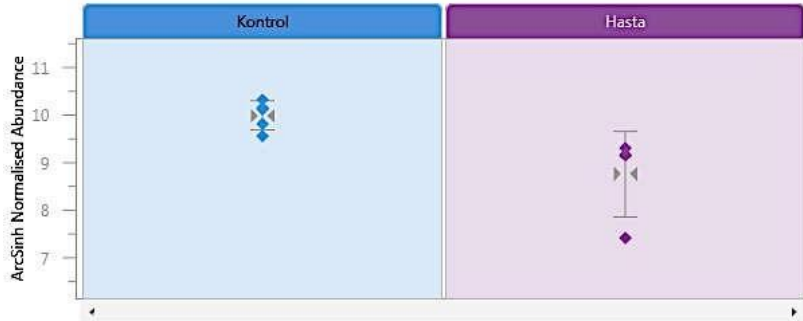
Peptides 1 (1)

Score 5.36

Anova 0.02

Fold 2.87

- Anova p-value  $\leq 0.05$
- Max fold change  $\geq 1.2$



Şekil-31: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet C-X-C chemokine 10 düzeyindeki değişim

Accession Q8MJ46

Description PP1G\_CANLF Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit OS=Canis lupus

Peptides 13 (6)

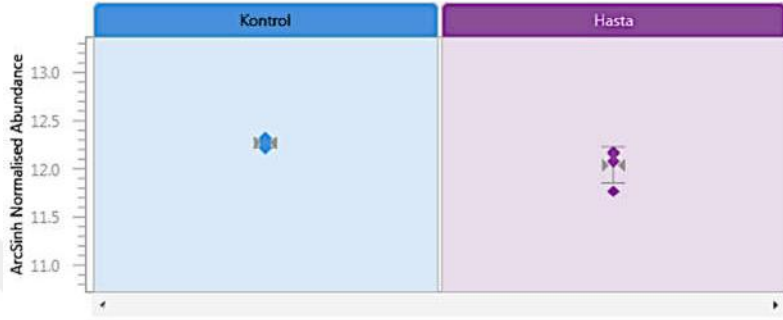
Score 83.60

Anova 0.03

Fold 1.24

● Anova p-value  $\leq 0.05$

● Max fold change  $\geq 1.2$



Şekil-32: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet serine/threonine-protein phosphatase düzeyindeki değişim

Accession Q863Z4

Description MTPN\_CANLF Myotrophin OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=MTPN PE=3 SV=3

Peptides 19 (16)

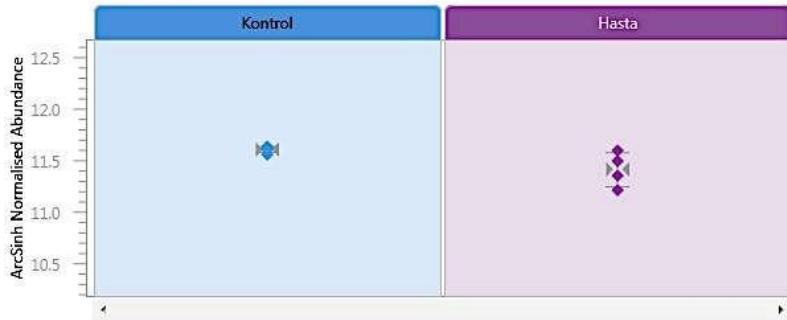
Score 132.02

Anova 0.04

Fold 1.20

● Anova p-value  $\leq 0.05$

● Max fold change  $\geq 1.2$



Şekil-33: Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet myotrophin düzeyindeki değişim

Accession P05124

Description KCRB\_CANLF Creatine kinase B-type OS=Canis lupus familiaris OX=9615 GN=CKB PE=1 SV=1

Peptides 51 (45)

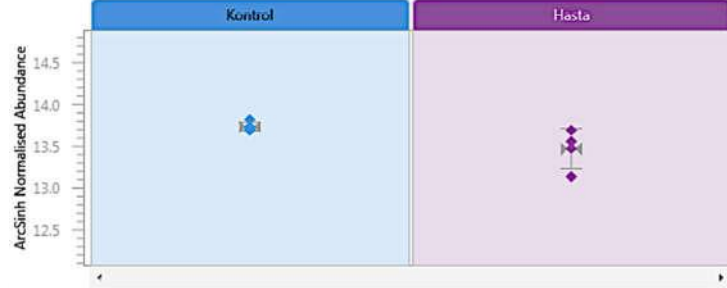
Score 380.59

Anova 0.04

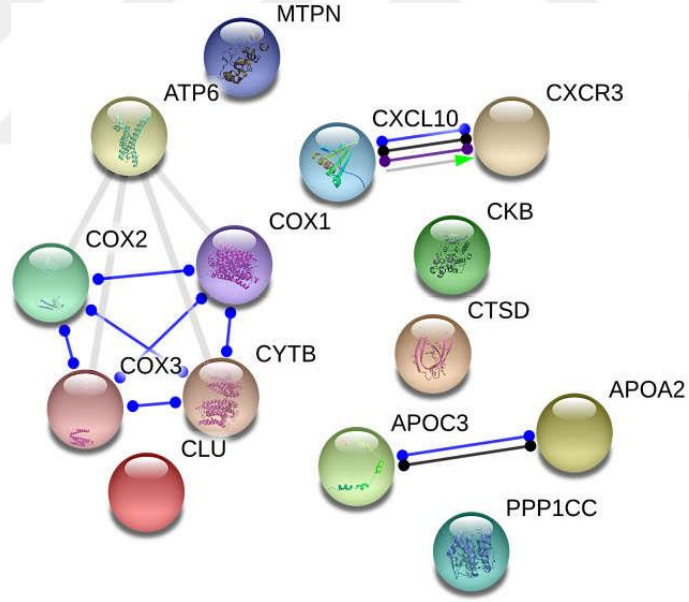
Fold 1.28

● Anova p-value  $\leq 0.05$

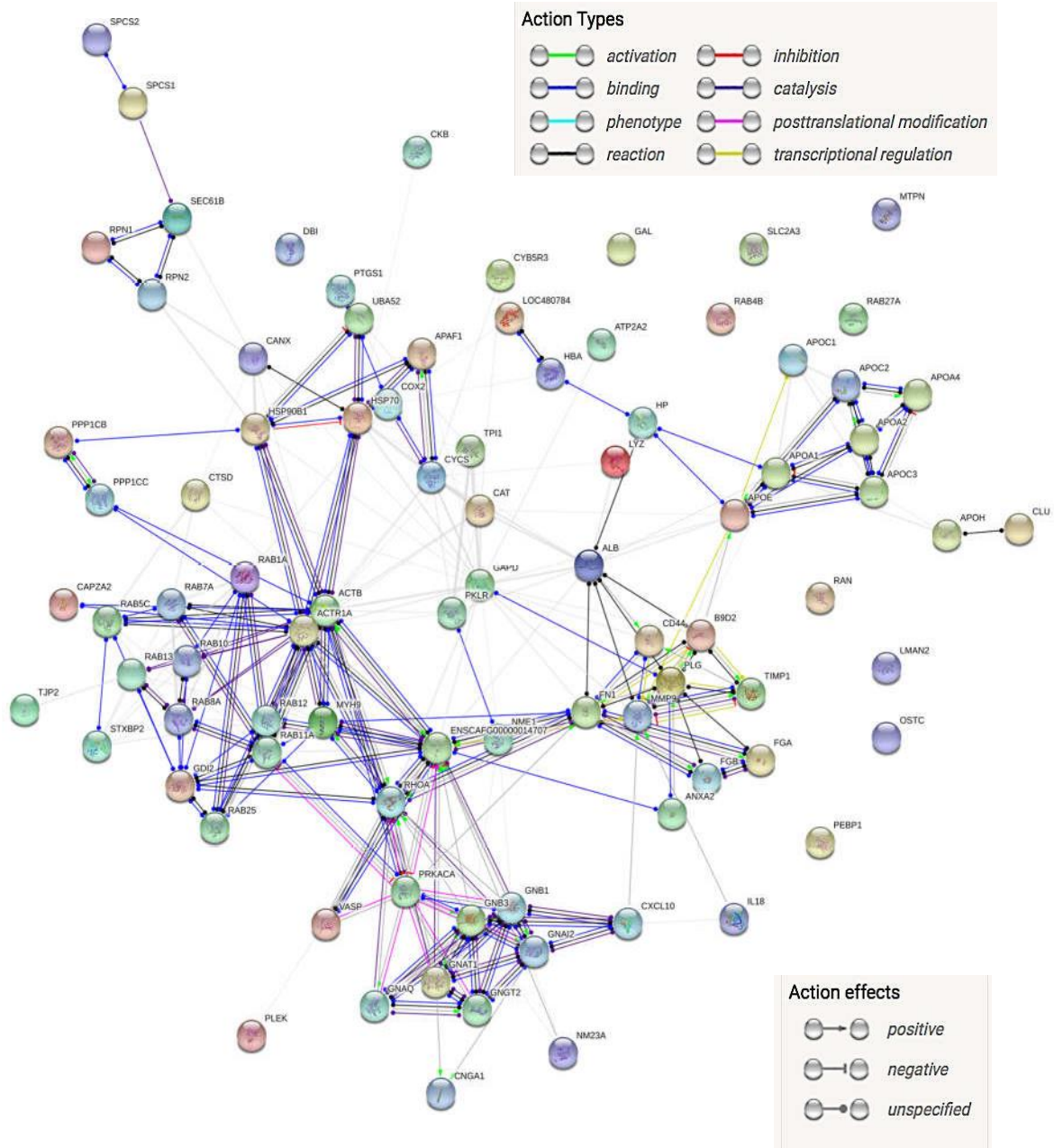
● Max fold change  $\geq 1.2$







Şekil-34: Kontrol ve test grubunda platelet creatine kinase B-type düzeyindeki değişim



Şekil-35: Bu çalışmada plâtelâlerden elde edilen istatistiksel 10 adet anlamlı protein ve fraksiyonlarının birbirini ile etkileşimi (protein-protein interaksyonu) – string-db.org ile üretilmiştir. APOC3: Apolipoprotein C-III; APOA2: Apolipoprotein A-II; CLU: Clusterin; CTSD: Cathepsin D; CKB: Creatine kinase B-type; CYTB: Cytochrome B oxidase; COX1: Cytochrome C oxidase subunit 1; COX2: Cytochrome C oxidase subunit 2; COX3: Cytochrome C oxidase subunit 3; CXCL10: C-X-C motif chemokine 10; CXCR3: C-X-C chemokine receptor type 3; MTPN: Myotrophin; PPP1CC: Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit; ATP6: ATP synthase subunit A



**Şekil-36:** Bu çalışmada platelet izolatlarından elde edilen ve *Canis lupus familiaris* protein veri bankasına göre tanımlanan proteinler (n=107); bu proteinlerin birbiri ile olan ilişkisi (protein – protein intetaksiyonu). RAB proteinleri ve MMP’ler ile apolipoproteinler (Apo) arasındaki yoğun bağlantı dikkat çekicidir. String-db.org ile oluşturulmuştur.

İnteraksiyonlarda sorgulanan ilk (  ) ve ikinci (  ) proteinler; içi boş olanlar (  ) 3D yapısı bilinmeyenler, içleri dolu olanlar (  ) 3D yapısı bilinen ya da tahmin edilen proteinler.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada öncelikli olarak kalp yetmezliği tanımlanan köpeklerde sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında platelet (trombosit) proteinlerindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bugüne kadar köpeklerde kalp yetmezliğinin tanımlanması adına klinik süreç, görsel tanısal unsurlar (EKG, radyoloji, MR ve CT), serum biyobelirteçleri (cTnI ve NT-Pro-BNP vb.) ve ekokardiyografi temelli çalışmalar olmasına rağmen (Schober ve ark., 2010), insan ve veteriner hekimliğinde platelet proteomlarının kalp yetmezliği ile ilgisini ortaya koyacak bilgiler eksik kalmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada; kalp yetmezliğinin etiyojisi, rutin klinik-laboratuvar parametreleri ve görüntülü tanı bulgularındaki detaylardan ziyade, platelet proteomik sonuçları ve bu proteinlerin kalp yetmezliği patofizyolojisinde alabilecekleri roller öncelik almıştır. Bununla birlikte, bu çalışma kalp yetmezliğinde hemostazis (koagülasyon) değerlendirilmesinde geleneksel ölçümlerin (PT ve aPTT) yanısıra, tromboelastografik olarak “velosite curve” analizi ile trombin oluşumu ve fibrinolitik sistem değişimlerini ilk olarak ortaya koymakta, böylece insanlar için de “tek sağlık” konseptine uygun faydalı bir model oluşturmaktadır.

### 5.1. Kalp Yetmezliği ve Klinik Süreç:

Bu çalışma ACVIM'e göre semptomatik kalp yetmezliği tanımlanan ve daha önce tedavi girişimi yapılmayan olguları (kategori C) kapsamaktadır (Atkins ve ark., 2009). Bu çalışma materyalinden (test grubu) elde edilen anamnez ve fiziksel muayene bulgularının daha önce bu konuda yapılan çalışmalara (Schober ve ark., 2010) benzerlik göstermesi; köpeklerde kalp yetmezliği ile ilgili tanısal sürecin başlatılmasında hasta sahibinden alınan bilgilerin ve klinik bulguların önemini bir kez daha göstermiştir. Çalışmaya dahil edilen köpeklerde kalp hastalığı ile ilgili olarak en az 3 aydır şikayetlerin olması, öncelikli olarak çabuk yorulma, öksürük, solunum güçlüğü, karında şişlik (asites), bayılma (senkop), iştahsızlık ve zayıflama



(kardiyak kaşeksi) belirtilmesi; kronik kalp yetmezliğinin hasta sahibi bilgilerine uygunluk göstermiştir. Schober ve ark. (2010) CVHD ve DCM nedenli kronik kalp yetmezliği tanımlanan köpeklerde egzersiz intoleransı (%100), öksürük (%85), taşipnö-dispnö (%73) ve senkop (%22) görülme oranının henüz kalp yetmezliği şekillenmeyen olgulara göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. CVHD ve DCM diyastol ve sistol sonu LV volüm fazlalığı ön yükü (preload) artırmakta; takiben pulmoner ödem ve konjestif kalp yetmezliği gelişimi egzersiz intoleransına neden olmaktadır (Little ve ark., 2000).

Kalp yetmezliğinin iki önemli faktörü DCM ve CVHD'dir (Schober ve ark., 2010). DCM'nin öncelikli olarak büyük ırk köpeklerde, CVHD'in de orta ve küçük ırklarda yaygın olduğu gerçeği (Wendy, 2011), çalışma materyalimizi oluşturan köpek ırkları ile desteklenir niteliktedir. Test (hasta) grubu köpeklerin ortalama yaşlarının ( $8,1 \pm 5,1$  yıl ve %75'lik dilim 13,2 yıl), kontrol köpeklere göre daha yüksek ( $3,3 \pm 3,1$  ve %75'lik dilim 4,2 yıl) olması; kalp yetmezliğinin insanlarda olduğu gibi köpeklerde de daha çok geriyatrik dönemde ortaya çıkabileceğini bir kez daha göstermiştir.

Fiziksel muayene bulgularından bu çalışma için beden sıcaklığı ( $T^{\circ}$ ), kalp (P) ve solunum sayıları (R) ile birlikte kapillar yeniden dolun süreleri (KDS) kayıt altına alınmış; her iki grupta  $T^{\circ}$ 'nin minimum ve maksimum değerleri referans aralıklarda kalmıştır. Bu tespit çalışma materyalinde kalp yetmezliğine eşlik eden ya da altta yatan bir enfeksiyon durumunun olmadığını düşündürmüştü; tam kan sayımı ve serum biyokimyasal analizlerle de bu düşünce güçlendirilmiştir. Test grubunda ortalama P, R ve KDS verilerinin kontrol grubunda tespit edilenlere göre daha yüksek bulunması, hatta test grubunda maksimum P, R ve KDS değerlerinin sırasıyla 182/dk, 100/dk ve 4 sn olarak not edilmesi kalp yetmezlikli köpeklerde taşikardi, taşipne ve periferel dolaşım yetmezliğinin göstergeleri olmuştur. Klinik süreç dikkate alındığında, köpeklerde kronik kalp yetmezliğinde solunum sistemi şikayetlerinin (öksürük, taşipnö vb) öncelik aldığı vurgulanmaktadır (Schober ve ark., 2010). Taşipnönün kalp yetmezliğine bağlı plevral efüzyon ve/veya pulmoner ödeme bağlı olduğu, periferel dolaşım yetmezliğinin sol kalp (ileri atım) yetmezliğinden ileri geldiği ve

taşikardinin artan metabolik ihtiyaçların karşılanması adına bilinen kardiyopulmoner reaksiyonlar olduğu ifade edilmektedir (Abbot, 2016).

Klinik muayene sürecinde kalp hastalıklarının tespitinde kardiyak oskültasyon önemli bir yer tutmaktadır. Üfürüm bazen fizyolojik (masum – innocent) olabileceği gibi çoğu zaman klinik şikayetlerle birlikte patolojik olarak değerlendirilmektedir (Martin ve Corcoran, 1997). Kardiyak üfürümler daha çok mitral ve triküspid kapaklardan elde edilmekte; birden (en hafif) altıya kadar (en şiddetli) kategorize edilmektedir (Wendy, 2011). Bu çalışmada da kalp oskültasyonu ile özellikle mitral kapak punkta maksimasından en az 3 ve üzeri kardiyak üfürüm alınmış; üfürüm şiddetleri prekordiyal thrill varlığı ile de (4 ve üzerinden itibaren hissedilmektedir) konfirme edilmiştir.

Test grubunda non-invasif kan basıncı ölçümleri olarak sistolik (SAP), diyastolik (DAP) ve ortalama (MAP) değerlerin sırasıyla 130 – 165 mmHg, 85-100 mmHg ve 135-164 mmHg olarak tespit edilmesi; kalp yetmezliğinde sistolik ve diyastolik basınçların yükselme eğiliminde olduğunu ortaya koymuştur (Schober ve ark., 2010). Bu tespitler kalp yetmezliğinde nöro-humoral düzenleyici mekanizmaların (SSS ve RAAS) aktive edildiğinin klinik göstergeleri olurken (Wendy, 2011) aynı zamanda da tedavi aşamasında anti-hipertansif ilaçların kullanım gerekliliğine de bir alt yapı oluşturmuştur (Oyama, 2011).

Görüntülü tanı teknikleri kalp hastalıklarının tanı ve monitorizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Toraks radyolojisi kalbin sınırları, büyüklüğü, damarsal yapıları ve akciğerlerin durumu hakkında ön bilgiler sunmaktadır (Schober ve ark., 2010). ACVIM'e göre klinik şikayeti olmayan (asemptomatik) ancak kardiyak üfürümü ve radyolojik olarak kalp büyümesi olan olgular "B2 grubu" kalp yetmezliği hastası olarak tanımlanmaktadır. Klinik şikayet gösteren, beraberinde üfürüm ve kalpte büyüme tespit edilen olgular da "C grubu" kalp yetmezliği hastaları olarak önerilmektedir (Atkins, 2009). Bu bilgiler kardiyomegalinin klinik düzeyde önce radyolojik olarak, daha sonra da ekokardiyografik muayene ile konfirme edilmesinin önemini göstermektedir (Martin ve Corcoran, 1997).

Bu çalışmada radyolojik olarak VHS incelendiğinde; kontrol grubu değerine göre test grubunda önemli bir artış belirlenmiş, böylece kardiyomegali varlığı ortaya

konmuştur. VHS köpek ırkları arasında referans değerlerde çok fazla varyasyon gösterdiğinden klinik bulgularla birlikte değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir (Schober ve ark., 2010). Kim ve ark. (2017) MMVD'li köpeklerde yaptıkları retrospektif bir çalışmada pulmoner ödem ve VHS ölçümlerinin prognostik değerlendirmede önemine vurgu yapmışlardır. Bu çalışmada test grubu hastalarında C sınıfı kalp yetmezliği tanımlamasına uygun olarak radyolojik muayene ile; kardiyomegali ile birlikte perihilar ödem, pulmoner ödem, kaudal vena kava dilatasyonu ve dorsale deviyasyonu, trakheanın dorsale deviasyonu, sağ ventriküler yapının sternuma teması ve pulmoner arter/venlerde dolgunluk saptanmıştır. Bu tespitlerin her biri şiddetlerine göre Schober ve ark. (2010)'nın önerisi doğrultusunda skorlandırıldığında (skor >4); köpeklerde konjestif kalp yetmezliğinin radyolojik olarak öngörülebileceği söylenebilir. Test grubu köpeklerde plevral serbest sıvı ve ascites gibi radyolojik bulgularla beraber, jugular dolgunluk ve hepatomegali belirlenmesi; konjestif kalp yetmezliğinin (geri dönüşüm yetmezliğinin) klinik yansımaları olmuştur (Alvarez, 2011; Martin ve Corcoran, 1997).

EKG kalp ritminin değerlendirilmesinde önemli kabul edilmektedir (Baisan, 2016). Bu çalışmada test grubu köpeklerde öncelikli olarak sinüs taşiaritmi ve atrial fibrilasyon tespitlerini daha az oranda atriyal ve ventriküler prematür kompleksler takip etmiştir. Bu değişimler kalp hastalıklarının seyri sırasında köpeklerde tespit edilen EKG bulgularını (Wendy, 2011) destekler niteliktedir. EKG ile tespit edilen sol atriyal büyüme, sağ atriyal büyüme ve sol ventriküler büyümenin ekokardiyografik olarak da doğrulanması; EKG'nin kalpteki morfolojik değişimleri öngörebilme kabiliyetini güçlendirmektedir. Baisan ve ark. (2016) CVHD ve DCM'li köpeklerde sinüs taşikardi, sinüs arrest, ventriküler taşikardi, ventriküler prematür kompleks ve atriyal fibrilasyon belirlemelerine rağmen bazı olgularda normal EKG sonuçları elde etmişlerdir. Benzer şekilde Morales ve ark. (2001) DCM'ye bağlı konjestif kalp yetmezlikli köpeklerde supraventriküler ve ventriküler taşidisritimleri tespit etmişler, en yaygın ritim bozukluğu olarak da atriyal fibrilasyonu göstermişlerdir. Morales ve ark. (2001) aynı çalışmada ventriküler taşiaritminin kalp yetmezliğinde az görüldüğünü ancak prognostik önemde olduğunu vurgulamışlardır.

Kalp yetmezliğinde ileti bozuklukları %34, EKG dalgaları ile ilgili morfolojik bozukluklar %62 düzeyinde görülürken, olguların %26'sında normal sinüs ritminin olabileceği unutulmamalıdır (Morales ve ark., 2001).

Bu çalışmanın amacı kalp yetmezliğinin tanımlanması ve bu tanımlama için öncelikli olarak ekokardiyografik detayların geliştirilmesi ve tartışılması olmayıp, platelet proteomlarının belirlenmesi ve bunların içinden potansiyelli yeni kardiyak biyobelirteçlerin önerilmesidir. Bu nedenle test materyali içinde kalp yetmezliğinin etyolojik nedenlere göre yani DCM ve MMVD'e bağlı kalp yetmezliği şeklinde alt grupları oluşturulmamış; her iki hastalığın da son evresi olan kronik (konjestif) kalp yetmezliği ortak bir değer olarak düşünülmüştür (Schober ve ark., 2010). Bu çalışmanın ileride adı geçen hastalıkların (DCM ve MMVD) farklı birer grup olarak planlanacağı kapsamlı çalışmalara bir altyapı oluşturabileceği kanısındayız.

Kalp hastalıklarının tanısında ekokardiyografik muayene altın standart olarak kabul edilmektedir (Boon, 2011; Schober ve ark., 2010). Bu çalışmanın test grubu materyalini insanlarda olduğu gibi köpeklerde de kronik kalp yetmezliğinin öncelikli nedenleri olarak kabul edilen MMVD ve DCM'li hastalar oluşturmuştur. Kronik kalp yetmezliği tanımlaması için kalp ekokardiyografik olarak önerilen yaklaşımlar temelinde farklı pencerelerden (sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyi, uzun eksen 4-5 boşluk görünümü, sol apikal 4-5 boşluk görünümü vb.) ve farklı metotlar ile (2D, M-mode, renkli Doppler ve CW/PW Doppler) muayene edilmiş; kalp boşlukları ve damarları ile ilgili geometrik ve fonksiyonel değerlendirmeler önerildiği gibi (Schober ve ark., 2010) gerçekleştirilmiştir.

Geometrik ölçümlere bakıldığında, kontrole göre sağ ventrikül internal diyastolik çapının (RVDD) test grubunda önemli ölçüde yüksek belirlenmesi; kronik kalp yetmezliğinde sağ kalp etkilenimini desteklemektedir. Konjestif kalp yetmezliğinde plevral efüzyon, asites ve hepatomegali görülmesinde; pulmoner damarlar, vena cava caudalis ve hepatik venalardaki dolgunluğun venöz hidrostatik basıncı artırması rol oynamaktadır (Wendy, 2011). Bu nedenle test grubu köpeklerde RVDD'deki artış; artan venöz kapasitansın (pasif konjesyonun) ve sağ atriyal basınç yükselmesinin indirek göstergesi olarak yorumlanmış, bu durum dolaylı olarak LV

dolumu bozarak fraksiyonel kasılma (%FS) ve kardiyak debinin düşmesine zemin hazırlamıştır (Boon, 2011).

Bu çalışmada DCM'ye bağlı kalp yetmezliği tanımlamasında ekokardiyografik ölçümler sonucu toplam skorun  $\geq 6$  olması temel kriter alınmıştır (Wendy, 2011). Bu sisteme göre referans değerlerle karşılaştırıldığında LV ilişkili geometrik (LVDD, LVDs ve LV yuvarlaklaşma indeksi) ve fonksiyonel parametrelerdeki (%FS ve %EF) anlamlı her bir değişim üç puan ile skorlandırılmış, sol ve sağ atriyal büyümeler, EPPS artışı ve aritmi varlığı gibi detaylar da birer puanla ikincil önemde sıralanmışlardır (Wendy, 2011).

MMVD varlığı; sağ parasternal uzun eksen ve sol apikal 4-5 boşluk pencerelerinde mitral kapaktaki kalınlaşma ve dejenerasyonlar (endokardiozis) ile, mitral kapak prolapsusu (MVP) varlığı da kapaktaki düzleşme ya da özellikle mitral anterior kapağın LA içine doğru deplase olmasıyla karakterize edilmiştir (Boon, 2011). MMVD'li olguların çalışma kapsamına alınmasında klinik olarak mitral üfürüm, radyolojik olarak kardiyomegali ve pulmoner ödem saptanması, ekokardiyografik olarak da orta veya şiddetli derecede mitral regürgitasyon, LVDD ve LVDs'de artma (LV remodeling) ve mitral akım E/A oranında artış (diyastolik yetmezlik göstergesi) tespit edilmesi etkin olmuştur (Schober ve ark., 2010). MMVD'li hastalarda mitral regürgitan akımlar interatriyal hacim ve basıncı artmakta, bu da pulmoner venlerde dolgunluk, hidrostatik basınç artışı ve beraberinde pulmoner ödem geliştirmektedir (Wendy, 2011). Pulmoner ödem kronik süreçte pulmoner hipertansiyon ve sağ atriyal basınç artışı ile sağ kalbin geometrik ve fonksiyonel değişimlerine ve sonuçta konjestif kalp yetmezliğine yol açmaktadır (Goutal, 2010).

Kalp yetmezliği gelişim sürecinde kalpte diyastol ve sistol sonu volüm ve basınç artışlarına cevap olarak LV'de hacimsel ve şekilsel değişim (LV remodelling) oluşmakta, bu değişim vücut ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için fizyo-patolojik bir savunma mekanizması olarak stroke volüm ve kardiyak debinin belirli bir çizgide tutulabilmesine olanak sağlamaktadır (Little, 2000). Bu adaptasyon sürecinde kalbin hacimsel, şekilsel ve fonksiyonel yanıtları vücut ihtiyaçlarını karşılamada yetersiz kaldığında; hastalarda klinik, laboratuvar ve görsel tanısal unsurlara yansiyacak şekilde kalp yetmezliği kendini belli etmektedir. Bu çalışmada kalp yetmezliği

tanımladığımız köpeklerde LVDD, LVDs ve LA/Ao değerlerinin kontrol ve referans değerlerden (Boon, 2011) yüksek çıkması; sol kalpteki geometrik yeniden şekillenmeyi ortaya koymuştur. Vörös ve ark. (2009) sağlıklı köpeklerde yaptıkları çalışmada 12-35 kg canlı ağırlık aralığı için EPSS değerinin 1,1-3,1 mm olduğunu rapor etmişlerdir. Holler ve Wess (2014) DCM'li köpeklerde EPSS değerinin 20 mm'ye kadar çıkabildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada kontrol grubu köpeklerin ortalama canlı ağırlığına (25 kg) göre EPSS değeri  $3,1 \pm 1,1$  mm; test grubunda ise 22 kg ortalama ağırlık için  $6,8 \pm 2,1$  mm belirlenmesi; LV'deki şekilsel değişimi destekleyen diğer bir bulgu olmuştur.

Fonksiyonel değişimlerle ilgili olarak, bu çalışmada ileri atım yetmezliğinin bir göstergesi olarak LV - FS değerinde ( $\%26 \pm 6$ ) kontrole göre ( $\%34 \pm 3$ ) önemli azalma saptanmıştır. Bu tespitimiz Vollmar'ın (1999) sağlıklı köpeklerle ( $\%34 \pm 4$ ) karşılaştırıldığında sub-klinik ( $\%25 \pm 4$ ) ve klinik DCM'li olgularda saptadığı değerlere ( $\%20 \pm 8$ ) benzerlik göstermiştir. Schober ve ark. (2010) DCM'ye bağlı konjestif kalp yetmezliği gelişen köpeklerdeki LV - FS oranının ( $<\%25$ ) MMVD'ye bağlı kalp yetmezliği gelişen olgulara göre ( $>\%25$ ) daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Kim ve ark. (2017) da MMVD'li olup konjestif kalp yetmezliği gelişen ve gelişmeyen köpeklerde LV-FS ve LV-EF değerlerinde istatistiksel bir fark olmadığını, mitral E/A oranının kontrole göre MMVD'li ve MMVD'ye bağlı kalp yetmezlikli köpeklerde daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Bir başka çalışmada (Schober ve ark., 2010) köpeklerde DCM ve MMVD nedenli konjestif kalp yetmezliklerinde trikuspidal regürgitan akımların varlığı ( $\%71-86$ ) ve şiddetinden ( $>3$  m/s) bahsedilmiştir.

CW ve PW Doppler ölçümlerinde ana damarlardaki ve kalp kapaklarındaki (MV ve TV) akımlar değerlendirilmiştir. Ao ve MPA maksimal velositeleri gruplar arasında önemsiz varyasyon göstermiştir. Aort ejeksiyon süresi (Ao-ET) test grubunda kontrollere göre daha kısa not edilmiş; bu değişim kalpte şekillenen taşikardi ile ilişkilendirilmiştir. Ao-ET ölçümü; kalpte sistolik fonksiyonların değerlendirilmesinde kullanılan önemli parametrelerden (LV-EF, LV-FS, aortic pre-ejection period vb.) biridir (Boon, 2011). Bu çalışmada Ao-ET süresindeki azalma kardiyak debi için gerekli zamanı kısaltıp LV'de diyastol sonu basıncı artırarak geometrik ve fonksiyonel değişimlere yol açmış (Little, 2000) olabilir.

Bu çalışmada mitral ve trikuspid kapak akımları değerlendirildiğinde; MV-E/A oranı her iki grup arasında önemli, ancak TV-E/A önemsiz değişim göstermiştir. LV diyastolik performansı non-invasif olarak Doppler transmitral akımın tespiti ile yapılabilmektedir (Schober ve ark., 2010). Test grubunda MV-E/A oranının kontrol grubuna göre belirgin artış göstermesi köpeklerde diyastolik fonksiyon bozulmasının bir göstergesi olmuştur (Smith ve ark., 2016). Mitral akım profili birçok faktör tarafından belirlenen kompleks bir oluşumdur ve bu oluşumda; sol atriyal basınç, relaksasyon, LV sistolik basınç, ventriküler suction (emiş gücü), preload (ön yük), kalp frekansı ve atriyal fonksiyonun rol oynadığı unutulmamalıdır (Boon, 2011). Kalp yetmezlikli köpeklerde erken LV disfonksiyon göstergesi olarak transmitral akımda gecikmiş relaksasyon (pik E velositesi yüksek, deselerasyon süresi uzun >160 ms, pik A velositesi düşük ve E/A: <1) tespit edilirken (Schober ve ark., 2010), ileri dönem kalp yetmezliğinde LV dolum basıncı artışına bağlı olarak “psödonormal” ya da bu çalışmamızda olduğu gibi “restriktif” transmitral akımlar (mitral E/A>2) görülmektedir (Schober ve ark., 2010).

## **5.2. Kalp Yetmezliği ve Hemogram:**

İnsanlarda olduğu gibi köpeklerde de sistemik inflamasyonun (SIRS) konjestif kalp yetmezliği gelişiminde rolü olduğu ifade edildiğinden bu çalışmada kalp yetmezlikli olgularda ve sağlıklı kontrollerde tam kan sayımı ile birlikte geniş kapsamlı serum biyokimyasal profil değerlendirilmiş, ancak detay analizler (yangısal sitokin panel ve akut faz proteinleri) yapılamamıştır. İnsanlarda (Testa ve ark., 1996; Vistnes ve ark., 2010) ve sınırlı sayıda köpek çalışmasında (Zois ve ark., 2012) kalp hastalıklarının sitokin panelinde yaptığı değişimler ortaya konmuş; bu proteinlerin kronik kalp yetmezliği ve LV fonksiyon yetersizliğinde rolü olabileceği ifade edilmiştir.

Lökosit sayısı ve bu total sayıyı oluşturan hücre gruplarındaki (diferansiyel lökosit sayıları) değişimler, yangısal cevabın ortaya konmasında klinik süreçte yaygın kullanılan parametrelerdir (Willard ve Tvedten, 2012). Bu çalışmada lökogram verilerinde total lökosit (WBC) ve diferansiyel lökosit sayıları gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiş, ortalama değerlere yansımayan bu değişimlere rağmen test grubunda maksimum WBC ve nötrofil sayıları sırasıyla

21.900/ $\mu$ L ve 15.500/ $\mu$ L olduğu dikkat çekmiştir. Bununla birlikte WBC ve nötrofil sayılarının test grubunun %75'lik diliminde sırasıyla 19.160/ $\mu$ L ve 13.130/ $\mu$ L olması stress lökogram ve/veya hafif SIRS varlığını düşündürmüştür. Stress lökogram varlığı için nötrofilik lökositosisle birlikte lenfopeni, eozinopeni, monositosis ve bazofili olması beklenmektedir (Willard ve Tvedten, 2012). Paltrinieri ve ark. (1998) şiddetli kalp yetmezlikli köpeklerde nötrofilik lökositosis varlığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada test grubunun büyük bir kesiminde (%75) nötrofilik lökositosis olmasına rağmen lenfopeni başta olmak üzere diğer unsurların oluşmaması; bu değişimlerin SIRS ile ilgili olabileceğini güçlendirmektedir. Test grubunda bazofil sayısı kontrollere göre daha düşük belirlense de referans aralıklarda kalmıştır. Bu çalışma bulgularımız Hamilton-Elliott ve ark. (2018)'nin konjestif kalp yetmezlikli köpeklerde kalp hastalığı olmayanlara göre nötrofil, band nötrofil ve monosit sayılarını anlamlı yüksek bulmaları; ancak, bu değişimlerin sağlıklı referans değerleri içinde kalmaları ile paralellik göstermiştir.

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

İnsanlarda kalp hastalıklarında eritrogram değişimlerini irdeleyen çalışmalar söz konusudur (Paltrinieri, 1998). Bu çalışmada eritrogram değerlerinde her iki grup ortalamalarında istatistiksel önemde farklılıklar tespit edilememiştir. Kontrol ve test grubunun eritrosit (RBC) sayısı ile hemoglobin, hematokrit (Hct) ve eritrosit indeks değerleri (MCV, MCH, MCHC ve RDW) normal sınırlar içinde kalmıştır. Bu çalışmada Hct değerinin test grubunda maksimum %54 olması ve bu materyalin %75'lik diliminde ortalama %50 belirlenmesi; Prihirunkit ve ark. (2014)'nin



MMVD'li olup konjestif kalp yetmezliği gelişen köpeklerde tespit ettikleri yüksek ve istatistiksel anlamlı Hct değişimlerine kısmen benzerlik göstermiştir.

Guglielmini ve ark. (2013) CVHD'li köpeklerde eritrosit RDW değerinin (%13,1 ± 1,0) sağlıklı kontrollere göre (%12,8 ± 0,8) önemli değişim göstermediğini, kalp yetmezliği gelişen ve gelişmeyen olgular arasında da istatistiksel bir fark oluşmadığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada (Guglielmini ve ark., 2013) RDW'nin CVHD'nin şiddeti ile ilgili LA/Ao oranı ile anlamlı ancak zayıf pozitif korelasyonu da rapor edilmiştir. RDW; anizositosisin göstergesi olup dolaşımdaki RBC'lerin hacimsel varyasyonu hakkında bilgiler vermekte, bu nedenle de daha çok anemilerin rejenerasyon kabiliyetini ortaya koymak için değerlendirilmektedir (Willard ve Tvedten, 2012). Son yıllarda kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkması ve kötü prognoz tespitinde RDW artışının öneminden bahsedilmektedir (Groenveld ve ark., 2008; Tang ve ark., 2006). Yu ve ark. (2016) MMVD'li köpeklerde yaptıkları retrospektif çalışmada anemi ve kardiyorenal sendrom ilişkisini irdelemişler; kalp yetmezliği olup anemi gelişen olgularda yaşam süresinin (ortalama 13 ay) anemisi olmayanlara göre daha kısa (28 ay) olduğunu tespit etmişlerdir.

İnsanlarda kalp yetmezliklerinde ve özellikle kedilerde hipertrofik kardiyomyopatilerde (HCM) platelet aktivasyonu ve bununla ilgili komplikasyonlara (tromboembolizm) sıklıkla rastlanmaktadır (Wendy, 2011). Bu nedenle bu çalışmada da platelet sayısı ve indeksleri (PCT, MPV ve PDW) kayıt altına alınmış; test grubunda platelet sayısının %25 ve %75'lik dilimdeki dağılımı sırasıyla 204.000/μL ve 461.000/μL olarak referans sınırlarda (Willard ve Tvedten, 2012) saptanmıştır. Benzer şekilde Prihirunkit ve ark. (2014) MMVD'li olup konjestif kalp yetmezliği gelişen köpeklerde platelet sayılarını kontrollere göre daha yüksek ancak referans sınırlarda belirlemişlerdir.

Bu çalışmada platelet indeksleri ile ilgili olarak ortalama değerler incelendiğinde; test grubunda PDW değeri kontrole göre daha düşük çıkarken, PCT değerleri daha yüksek belirlenmiş, MPV'de ise istatistiksel farklılık oluşmamıştır. CVHD'li köpeklerde sağlıklı kontrollere göre PCT değerleri daha düşük, MPV ve PDW değerleri ise daha yüksek tespit edilmiştir (Tong, 2017). Aslan ve ark. (2013) kalp defektli ve pulmoner hipertansiyonlu çocuklarda PDW ve MPV değerlerinin

düştüğünü belgelemişlerdir. Khandekar ve ark. (2006) koroner arter hastalıklı ve miyokardiyal infarktüsli insanlarda platelet indekslerinde istatistiksel önemde artma tespit etmişlerdir. Chu ve ark. (2010) MPV artışının koroner arter hastalıklarla ilgisine ve prognostik önemine vurgu yapmışlardır. Fujita ve ark. (2015) MPV ve PDW'nin LV sistolik ve diyastolik fonksiyonlarla ilgisini ortaya koymuşlardır. İnsan ve köpek çalışmalarından elde edilen bu bilgiler arasındaki tutarsızlıkta; insanlarda koroner arter hastalıkları ve miyokardiyal infarktüsün köpeklere göre çok yaygın ve daha kolay tespit edilebilir olması etkin rol oynayabilir. İnsanlarda platelet sayı ve indekslerinin kalp yetmezliği, koroner arter hastalıkları ve miyokardiyal infarktüs varlığı ve prognozu arasında bağlantılar kurulması; ileri de bu ve benzeri kalp hastalıklarında köpek ve kedilerde de plateletlerle ilgili detay çalışmaların yapılması gerekliliğini (Çolakoğlu ve ark., 2018) ortaya koymaktadır.

### **5.3. Kalp Yetmezliği ve Organ - Doku Hasar Belirteçleri:**

Kalp yetmezliği; ileri atım ve geri dönüşüm yetmezlikleri olarak doku ve sistemlerde hasarlanma ve yetersizliklere yol açabilmektedir (Aziz, 2013; Wendy, 2011). Bu nedenle hastaların sadece klinik ve görüntülü tanı teknikleri ile değerlendirilmesi, kalp yetmezliği ile ilgili multi-organ hasarlarının gözden kaçmasına ve tedavi etkinliğinin azalmasına neden olabilir. Bu kapsamda bu çalışmada sağlıklı kontrollerle karşılaştırılarak test grubunu oluşturan kalp yetmezlikli köpeklerde rutin biyokimyasal profil irdelenmiş; kalp, böbrekler, karaciğer, tiroid ve elektrolit dengesi ortaya konmuştur.

Küçük hayvan ve insan hekimliğinde hastalıkların tanısında spesifik doku hasarını gösteren biyobelirteçlere ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Langhorn ve Willesen, 2015). Kalp hastalıkları ile ilgili; geçmişte bazı enzim aktiviteleri (AST, LDH ve CK-MB) kullanılmışken, günümüzde kardiyak troponinler (cTnI) ve natriüretik peptidler (NT-pro-BNP) öncelik almıştır (Bakirel ve Gunes, 2009; Çakıroğlu ve ark., 2009; Porciello ve ark., 2008). Serum cTnI ve NT-pro-BNP'nin sadece kalp kası ve ventrikül fonksiyon bozukluklarında değil başta renal problemler olmak üzere diğer hastalıklarda da yüksek düzeyde bulunması bilimsel çalışma ve pratik koşullarda bazen dezavantajlara neden olmaktadır (Langhorn ve Willesen, 2015; Porciello ve ark., 2008; Wendy, 2011). Bu nedenle bu çalışmada miyokardiyal

hasar belirteci olarak serum kardiyak troponin I (cTnI) çalışılmış; azotemi nedenli yükselmeleri ortaya koymak için de renal fonksiyon parametreleri (BUN ve Cr) belirlenmiştir.

Test grubu köpeklerde serum cTnI ortalama değerinin ( $0,15 \pm 0,1$  ng/mL) kontrole göre ( $0,04 \pm 0,02$  ng/mL) daha yüksek olması ve maksimum  $0,32$  ng/mL'ye kadar belirlenmesi; bu çalışmada kalp yetmezliğinde miyokardiyal hasar ve şiddetini ortaya koymuştur. Test grubunun %75'lik dilimde serum cTnI ortalamasına göre ( $0,24$  ng/mL; referans  $<0,07$  ng/ml) şiddetli miyokardiyal hasar geliştiği görülmektedir. Oyama ve Sisson (2004)'un kardiyomyopatili ve MMVD'li köpeklerde tespit ettikleri ortalama serum cTnI düzeyleri ile (sırasıyla  $0,14$  ng/mL ve  $0,11$  ng/mL) bu çalışma bulguları ( $0,15$  ng/mL) benzerlik göstermiştir. Linklater ve ark. (2007) MMVD'e bağlı ileri derecede konjestif kalp yetmezliği olan köpeklerin %40'ında serum örneklerinde cTnI'nin ölçülebilir düzeyde olduğunu ve ortalama değerinin  $0,24$  ng/mL çıktığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada test grubunun tüm olgularında cTnI'nin serumda ölçülebilir düzeyde olması ve referans değerlerden (Oyama ve Sisson, 2004) yüksek çıkması; köpeklerde miyokardiyal hasarın varlığı ve devam edebilirliğini göstermiştir.

Kalp yetmezliğinde özellikle sistolik fonksiyon bozukluğunda (ileri atım yetmezliğinde) kardiyorenal sendrom olarak tanımlanan ve renal hipoperfüzyon ile karakterize komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Brewer ve ark., 2012; Pouchelon ve ark., 2015). Bu çalışmada kalp yetmezliği tanımladığımız köpeklerde kardiyorenal sendrom varlığını belirlemek adına serumda renal fonksiyon biyobelirteçleri (BUN ve Cr) değerlendirilmiş; ancak, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı değişimler oluşmamıştır. İstatiksel düzeyde önemin oluşmamasında özellikle test grubu verilerinde geniş bir varyasyon olması da etkin olmuştur. Test grubunun %75'lik diliminde ortalama serum BUN değerinin  $33$  mg/dL, Cr'nin ise  $1,0$  mg/dL olarak belirlenmesi; kalp yetmezliğine bağlı pre-renal azotemi (BUN  $>30$  mg/dL) eğilimini ortaya koymuştur. Ortalama serum Cr'nin düzeyinin henüz referans sınırları aşmaması, kalp yetmezliği sürecinde adaptasyon mekanizmalarının (SSS ve RAAS) renal perfüzyonu koruyup plazma volümünü fizyolojik dengede tutabildiğinin bir göstergesi (Kemp, 2012) olarak düşünülmüştür.

Kalp yetmezliğinde renal fonksiyonların yanısıra, karaciğer de olumsuz etkilenebilmektedir (Alvarez ve Mukherjee, 2011). Bu çalışmada serum karaciğer enzim düzeylerinde her iki grup arasında istatistiksel önemde farklılık belirlenememiştir. Bunun olası nedeni olarak test grubunda serum ALT ve ALP düzeyleri kontrole göre daha yüksek olmasına rağmen standart hataların çok yüksek olması düşünülmüştür. Test grubunda serum ALT ve ALP'nin maksimum değerlerinin sırasıyla 305 IU/L ve 294 IU/L olarak kayıt edilmesi ve %75'lik dilimde serum ALT ortalamasının 128 IU/L, ALP ortalamasının da 173 IU/L olması kalp yetmezliğine bağlı hafif düzeyde hepatosit hasarını düşündürmüştür. Kalp yetmezliklerinde serum karaciğer enzim aktivitelerindeki artışın olası nedenleri olarak düşük kalp debisi ve/veya dolum basıncının artması sonucu pasif konjesyon gelişmesi ve hepatik perfüzyonun bozulması gösterilmektedir (Alvarez ve Mukherjee, 2011).

Kedi ve köpeklerde CVHD ve kardiyomiyopati nedenli konjestif kalp yetmezliğinde olguların %52'inde serum BUN artışı, %26'sında da karaciğer enzim aktivitelerinde yükselme belirlenmesi (Goutal ve ark., 2010), çalışma sonuçlarımızla kısmen uyumlu görülmektedir. Alvarez ve Mukherjee (2011) karaciğer etkilenmesine bağlı olarak serum bilirubin düzeyinin de artabileceğini (hiperbilirubinemi) ve total bilirubin düzeyinin 3 mg/dL'den daha yüksek olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada serum karaciğer enzimleri temelinde hepatik etkilenmenin hafif olması; test ve kontrol grupları arasında total bilirubin, total protein, albümin ve globulin düzeylerinde önemsiz varyasyonları açıklayabilir. İnsanlarda kalp yetmezliğinde serum albüminde azalma, globülinle birlikte total protein düzeylerin de artma rapor edilmesi; adı geçen parametrelerin köpeklerde de kalp hastalıklarının tanı ve monitorizasyonunda takip edilmesinin önemini göstermektedir. Serum total protein ve globülin düzeylerinin artması, kalp hastalığına eşlik eden inflamatuvar yanıtların ortaya çıkarılmasında katkı sağlayabilir görülmektedir (Verma ve ark., 2016).

Bu çalışmada rutin biyokimya profili içinde yer alan serum elektrolit düzeyleri de irdelenmiş; ancak sodyum, kalsiyum, fosfor ve potasyum düzeyleri arasında gruplar arasında istatistiksel farklılık belirlenememiştir. Oysa insanlarda kalp yetmezliğinde yaygın elektrolit bozuklukları olarak hiponatremi, hipokalemi ve

hipomagnezemi rapor edilmektedir. Bunların nedeni olarak da kardiyak debinin düşmesine bağlı olarak renal kan akımının azalması ve renal su ve elektrolit atılımının bozulması gösterilmektedir (Urso ve ark., 2015). Bu çalışmada test grubunda serum elektrolit düzeylerinin kabul edilebilir sınırlarda kalmasında köpeklerde kalp yetmezliğine cevaben oluşan neuro-hormonal hemostazisin (SSS ve RAAS aktivasyonları) etkili olduğu (Urso ve ark., 2015) söylenebilir.

İnsanlarda kalp hastalıkları ve glukoz metabolizması arasında önemli bağlantılardan bahsedilmektedir. Konjestif kalp yetmezliği olanlarda tip 2 diabetes mellitus görülme olasılığının arttığı ifade edilmektedir. Bu gelişimde; fiziksel aktivite kaybı, hipermetabolik durum, intrasellüler metabolik defektler, zayıf kas perfüzyonu ve kötü beslenmenin rol aldığı bildirilmektedir. Konjestif kalp yetmezliğinde sempatik aktivasyon nedeni ile insülin rezistansı artarken insülinin pankreatik beta hücrelerden salınımı da azalmaktadır (Tenenbaum ve Fisman, 2004). Bu çalışmada serum glukoz düzeylerinde kontrole göre test grubunda önemli bir değişim saptanamamıştır. Glukozun test grubunda maksimum değerleri dahi referans sınırlar içinde kalmıştır. Konjestif kalp yetmezlikli köpeklerde yapılan bir çalışmada (Goutal ve ark., 2010) %27 oranında hiperglisemi saptanmış, diğer çalışmada da (Brady ve Drobotz, 2004) tedavi verilmeden önce yapılan örneklemelerde hiponatremi ve referans değerlerin üstünde serum glukoz değerleri tespit edilmiştir. Bu değişimlerin tedavi etkinliği ve prognozu olumsuz etkilediği vurgulanmıştır (Brady ve Drobotz, 2004). Bu bilgiler insanlarda olduğu gibi köpeklerde de kalp yetmezliği ve diabetes mellitus gelişim riskini araştıran materyal sayısı daha yüksek çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir. Sasaki ve ark. (2009)'nın köpeklerde metformin tedavisi ile kalp yetmezliği progresyonunun yavaşlatılabileceğini ileri sürmeleri bu konuya farklı bir bakış açısı getirmiştir.

Kalp yetmezliğinde zayıf doku perfüzyonuna bağlı olarak pankreatitis gelişimini bildiren insan (Jiang ve ark., 2002) ve köpek çalışmaları (Han ve ark., 2015) olmasına rağmen bu çalışmada ACVIM kalsifikasyonuna göre "C sınıfı" kalp yetmezliği tanımladığımız köpeklerde serum amilaz değerlerinde kontrollere göre anlamlı bir değişim saptanamamıştır. Serum amilaz ölçümlerinin pankreatitis varlığını ortaya koymak için sensitivite ve spesivitesinin düşük olduğu, bu nedenle öncelikli olarak köpeklere spesifik lipase'in ölçülmesi önerilmektedir (Willard ve

Tvedten, 2012). Serum amilaz ve lipaz değerlerinin normal değerlerden en az 3 kat artması ile birlikte klinik uyum olduğunda pankreatitis tanısına gidilmesi tavsiye edilmiştir (Jiang ve ark., 2002). Bu çalışmada serum BUN değerleri temelinde test grubunda hafif pre-renal üremi belirlenmesi, serum amilaz değerlerinde kontrolle karşılaştırıldığında (829 IU/L) renal atılımın azalmasına bağlı olarak maksimum 1050 IU/L tespitlerini açıklar niteliktedir. Bu değişimlere rağmen hem sağlıklı hem de test grubunda serum amilaz değerleri referans sınırlar içinde kalmış, test grubunda olası bir pankreatit varlığını destekleyen herhangi bir bulgu söz konusu olmamıştır. Bu çalışmada sekonder kalp yetmezlikleri materyal seçimi aşamasında kapsam dışında bırakılmıştır. Tiroid fonksiyonları kalp hastalıklarının altyapısında önemli bir yer tutmakta, yetersizlik durumunda LV fonksiyonlar olumsuz etkilenmektedir (Karlopudi ve ark., 2012; Stephan ve ark., 2003). Panciera ve Refsal (1994) deneysel konjestif kalp yetmezliği şekillendirdikleri köpeklerde serum serbest (fT4) ve total thyroxine (tT4) düzeylerinde azalma tespit etmişlerdir. DCM'li köpeklerde yapılan bir çalışmada düşük serum fT4 ve tT4 temelinde hipotiroidizm varlığına vurgu yapılmış (Karlopudi ve ark., 2012), ancak bir diğer çalışmada (Beier ve ark., 2014) Doberman pincherlarda DCM'nin etyoloji ve progresyonunda hipotiroidizmin bir rolü olmadığı ve tiroid destek tedavisinin klinik iyileşmeye katkı vermediği belirtilmiştir. Hipotiroidizimli hastalarda çabuk yorulma, mukoz membranlarda solgunluk, anemi potansiyeli ve karaciğer enzimlerinde artışların olması, konjestif kalp yetmezliğinin klinik sunumuna benzerlik göstermektedir (Karlopudi ve ark., 2012; Stephan ve ark., 2003). Bu bilgiler tiroid fonksiyonları ve kalp yetmezliği gelişimi arasında çelişkileri de beraberinde getirmektedir. Bu çalışmada da tiroid fonksiyonları diğer çalışmalarda olduğu gibi (Beier ve ark., 2014; Karlopudi ve ark., 2012) serum tT4 ve kolesterol düzeyleri ile değerlendirilmiş; her iki grup arasında ortalama serum tT4 ve kolesterol açısından istatistiksel önemde farklılık olmamakla birlikte, minimum ve maksimum değerleri de referans sınırlarda kalmıştır. Dolayısıyla, bu tespitler temelinde bu çalışmada test grubunu oluşturan köpeklerde kalp yetmezliği ile birlikte tiroid fonksiyonlarının normal olduğu gösterilmiştir.

#### **5.4. Kalp Yetmezliği ve Hemostazis (Koagülasyon):**

Bu çalışmada koagülasyon sistemi insanlarda olduğu gibi global pıhtılaşma süreleri (PT ve aPTT) ile değerlendirilmiş; global platelet fonksiyonları

tromboelastografik (TEG) muayene ve velosite curve (V-curve) dataları ile detaylandırılmıştır.

Bu çalışmada PT değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ( $16,4 \pm 0,4$  sn), test grubunda ( $19,0 \pm 0,9$  sn) hafif bir uzama gösterse de bu değişimler sağlıklı köpekler için bildirilen referans değerler (14 – 19 sn) içinde kalmıştır (Willard ve Tvedten, 2012). Kontrol grubunda aPTT değeri ( $92 \pm 4$  sn) referans sınırlarda (75 – 105 sn) kalırken, test grubunda rakamsal olarak uzama ( $146 \pm 77$  sn) olmasına rağmen standart hatanın yüksek olmasından dolayı istatistiksel öneme dönüşmemiştir. Koagülasyon zincirinde PT ekstrinsik ve yaygın sistemi değerlendirmek için kullanılırken, aPTT intrinsik ve yaygın sistemi değerlendirmek için ölçülmektedir (Lubas, 2010). Prihirunkit ve ark. (2014) MMVD'e bağlı olarak konjestif kalp yetmezliği gelişen köpeklerde hemostazisi geleneksel hemostazis parametreleri (PT, aPTT, AT-III, fibrinojen, D-dimer vb.) ile değerlendirmişler; ancak, TEG ve V-curve verilerine yer vermemişlerdir. Adı geçen çalışmada (Prihirunkit ve ark., 2014) sağlıklı kontrollere göre ( $7,1 \pm 0,5$  sn) kalp yetmezlikli köpeklerde PT değeri hafif düzeyde kısalmış ( $6,5 \pm 0,3$  sn), aPTT ise sırasıyla  $12,2 \pm 0,7$  sn ve  $12,0 \pm 0,3$  sn değerleri ile önemli bir farklılık göstermemiştir. Prihirunkit ve ark. (2014) değerlendirilen parametreler temelinde, konjestif kalp yetmezliği tanımlanan köpeklerde tromboembolik komplikasyon bulgusuna rastlamazken, laboratuvar düzeyinde hiperkoagülasyon ve prokoagülant aktivasyon (fibrinojen ve D-dimer artarken, AT-III ve protein C'nin azalması) tespitleri yapmışlardır. Bu (Prihirunkit ve ark., 2014) ve benzeri diğer çalışmalar (Eralp ve ark., 2011; Lubas ve ark., 2010; Yılmaz ve ark., 2017) PT ve aPTT'nin hipokoagülasyon varlığını göstermede başarılı bulunurken, hiperkoagülasyon durumlarında yetersiz kaldıklarını ortaya koymaktadır. Bu nedenle bu çalışmamız PT ve aPTT sonuçları ile; koagülasyon zincirinde istatistiksel önemde bir değişim olmadığını gösterse de TEG detay analizlere olan ihtiyacı da gündeme getirmiştir. TEG; hastadaki pıhtı oluşumu (primer ve sekonder hemostazis) ve fibrinolitik sistemle (tertiyer hemostazis) ilgili bilgiler sunmaktadır (Eralp ve ark., 2011; Yılmaz ve ark., 2017). Bu çalışmada TEG ile pıhtı oluşumunu (R, K, alfa açısı ve MA) ve fibrinolitik sistemi irdeleyen parametrelerle (EPL ve LY30) ile ilgili ölçümler gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında test grubu köpeklerde TEG ile ilgili ölçüm yapılan

parametrelerde istatistiksel önemde farklılıklar oluşmamıştır. Bu sonuçlar pıhtı oluşumu, pıhtı sağlamlığı ve fibrinolitik mekanizmaların kalp yetmezliğinde bozulmadığını göstermektedir. Bir önceki çalışmada DCM'li köpeklerde TEG parametreleri irdelenmiş; kontrollere göre R ve K sürelerinde uzama, oysa alfa açısı, MA ve G değerinde ise azalma belirlenmiştir (Yılmaz ve ark., 2017). Bu çalışmada ise test grubunda R ( $3,6 \pm 1,0$  dk) ve K süreleri ( $4,0 \pm 2,1$  dk) kontrol grubu değerlerine göre (R:  $2,2 \pm 1,0$  dk ve K:  $2,6 \pm 1,5$  dk) rakamsal olarak daha uzun görülse de, standart hatanın yüksek olmasından dolayı istatistiksel öneme dönüşmemiş ve köpekler için önerilen referans değerler içinde (R: 1,8 - 8,6 dk ve K: 1,3 - 5,7 dk) kalmışlardır. Bu çalışmada kontrol grubunda alfa açısı 42 - 80 derece ve MA değeri 31 - 53 mm aralığında iken, test grubunda sırasıyla 35 - 57 derece ve 36 - 53 mm olarak tespit edilmiştir. Her iki gruptaki bu tespitler köpekler için bildirilen referans değerler (alfa açısı: 36,9 - 74,6 derece ve MA: 42,9 - 67,9 mm) içinde kalmıştır (Bauer ve ark., 2009). Kontrol grubunda LY30 değeri (%0,0 - 12,0), test grubu ile (%0,0 - 40,1) karşılaştırıldığında; istatistiksel önem oluşmadığı için fibrinolitik mekanizmaların bozulmadığı (Bauer ve ark., 2009) düşünülmüştür.

TEG ile trombus ve fibrinolitik sistem hakkında daha detaylı bilgiler elde edilebilmek için V-curve analizleri geliştirilmiştir (Engelen ve ark., 2017). Bu çalışmada V-curve verisi olarak trombus oluşumu (MRTG, TMRTG ve TG) ve fibrinolitik aktivite ile ilgili parametreler (MRL, TMRL ve TL) incelenmiştir. Her iki grup arasında MRTG ve TG parametrelerinde istatistiksel önemde bir farklılık oluşmamış, test grubundaki TMRTG değerinde ( $5,0 \pm 1,7$  dk) kontrole göre ( $3,0 \pm 1,4$  dk) uzama eğilimi görülmüştür. Test grubu MRL ( $5,3 \pm 0,1$  mm/dk), TMRL ( $30,6 \pm 0,5$  dk) ve L değerleri ( $281 \pm 83$  dk) kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel düzeyde artma göstermiştir. Bu bulgular kalp yetmezliği tanımladığımız köpeklerde trombus oluşum süresindeki uzamayı ve fibrinolitik sistemdeki bozulmayı yansıtırken; PT, aPTT ve standart TEG parametrelerine (R, K, MA vb.) göre V-curve analizlerinin hassasiyetini de ortaya koymaktadır. Bu tespitimiz Engelen ve ark. (2017)'nin kedilerde TMRTG ve MRTG'nin koagülasyon aktivitesindeki değişiklikleri göstermede sensitiv parametreler olduklarını ileri sürdükleri çalışma sonuçları ile uyumlu görülmektedir.



Bu çalışmada korelasyon analizleri incelendiğinde; platelet sayısı ve indekslerinin (PCT, MPV ve PDW) TEG parametreleri ile (R, K ve alfa açısı) anlamlı bir ilişkisi olmadığı belirlenmiştir. PDW ile K değeri arasındaki pozitif korelasyon pıhtı kinetiği ve stabilitesi ile plateletlerin hacimsel (ve şekilsel) varyasyonu arasında güçlü bir bağın varlığını göstermiştir. R değerinin TMRTG ile pozitif ilgisi; pıhtı oluşumunda reaksiyon süresi (R time) kısaldıkça trombin oluşumunun da kısılacağı yani hiperkoagülasyon eğiliminin artacağını düşündürmektedir. Pıhtı kinetiğini gösteren TEG'nin K değeri ile trombin oluşumunu değerlendiren V-curve TG değeri arasındaki negatif korelasyon; platelet sayısı ve fonksiyonları, fibrinojen konsantrasyonu ve pıhtılaşma faktörleri azaldığında trombin oluşumunun da uzayabileceğini göstermektedir. Alfa açısı ve MA değerleri ile TMRTG ve TG arasında pozitif korelasyon saptanması; pıhtı stabilitesi ve gücünün oluşmasında trombin oluşum hızı ve kalitesinin önemine katkı yapmıştır. Bu bulgular koagülasyon zincirinde pıhtı oluşumundan (primer ve sekonder hemostazis) fibrinolitik olarak uzaklaştırılana dek geçen sürecin (tertiyer hemostazis) TEG V-curve analizleri ile detaylandırılabilceğini göstermiştir. Ayrıca bu konuda yapılacak çalışmalara da bir altyapı oluşturulmuştur.

### **5.5. Kalp Yetmezliği ve Platelet Proteomları:**

Plateletler; kan hemostazisi, yara iyileşmesi, inflamasyon, trombüs formasyonu ve son zamanlarda tümör gelişimindeki rolleri nedeni ile her geçen gün artan oranda araştırmacıların ilgisini çekmektedirler. Plateletlerin hücrel gelişim sürecinde sitoplazmik granülleri içinde ürettikleri ve depoladıkları proteinler nedeni ile bir çok hastalığın ortaya çıkarılmasında potansiyel biyobelirteçlere (biomarker) sahip olduğu düşünülmektedir. Köpeklerde edinsel hastalıklarda yapılan çalışmaların insanlar için de bir model olacağı düşünüldüğünde; sağlıklı ve hasta köpeklerin platelet proteomlarının belirlenmesi “tek sağlık” konseptine önemli katkı sağlayacaktır (Trichler ve ark., 2014).

Son yıllarda kütle spektrometresi (MS) ile birlikte kromatografik seperasyon teknikleri birleştirildiğinde protein tespitlerinin daha güçlü yapıldığı ifade edilmiştir. Ultra performans likit kromatografi (UPLC) tekniğinin; MS ve LC-MS yaklaşımına göre daha üstün olduğu, daha kısa sürede, yüksek doğrulukta ve düşük moleküler ağırlıktaki proteinlerin detaylandırılmasına olanak sağladığı belirtilmektedir. UPLC

sistemi MS ile kombine edildiğinde; bilinen (reviewed) proteinlerin hızlı ve doğru analizi ile birlikte kompleks matriks yapıda bilinmeyen (un-reviewed) proteinlerin de açıklaması yapılabilmektedir (Xue ve ark., 2014). Bu bilgiler sunduğumuz bu çalışmada proteomik analizler için güncel metotların kullanıldığını göstermiş; UPLC-ESI/QTOF/MS sistemi (ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight high-definition mass spectrometry) ile elde ettiğimiz sonuçların gradientleri önerildiği gibi (Xue ve ark., 2014) Waters UPLC analizi ile ortaya çıkartılmıştır. Bu yaklaşımla önce örneklerdeki makro moleküler ağırlıktaki proteinler (albümin, globülin, transferin, immunoglobulinler, haptoglobin vb.) immünolojik olarak ortamdaki uzaklaştırılmış, böylece geride kalan düşük moleküler ağırlıklı (low abundance) proteinlerin analizine imkan yaratılmıştır.

Platelet proteomik çalışmalarında kaliteli sonuçlar alınmasında uygulanan teknik kadar, platelet izolatlarının mümkün olduğunca saf ve kontamine olmaması gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada platelet izolasyonu literatüre uygun olarak (Trichler ve ark., 2014) elde edilmiş; saflık derecesini belirlemek için de TEG analizi ile platelet sayı ve fonksiyonları irdelenmiştir. Köpeklerde ultra-pure platelet izolasyonunda saflık değerlendirmesi flow sitometrik olarak da (CD-45 ve CD-61 kullanımı ile) yapılabilmektedir (Trichler ve ark., 2014). Bu çalışmamızda TEG ile plateletten fakir plazmada (PPP) hipokoagülasyon, plateletten zengin plazmada ise (PRP) hiperkoagülasyon saptanması; izolatlarda pellet içinde yeterli sayı ve fonksiyonda platelet varlığının göstergesi olmuştur.

Bu çalışmada sağlıklı (n=10) ve hasta köpeklerde (n=10) ortak bulunan platelet proteinleri araştırılmış; *Canis lupus familiaris* (evcil köpek) protein data bankasına göre toplam 107 protein (10 anlamlı), *Canidae* familyasına göre (kurt ve çakal gibi türlerin dahil olduğu) toplam 97 protein (7 anlamlı) ve *Caniformidae* familyasına göre de (deniz memelilerini de kapsayan üst sınıf) toplam 1.703 protein (181 anlamlı) tespit edilebilmiştir. Bu çalışmada öncelik evcil köpek için elde edilen bulgulara verilmiş; tartışma bu proteinler (107/10) üzerine geliştirilmiştir. Köpeklerde platelet proteomlarının belirlendiği çalışmalar yok denecek kadar azdır (Trichler ve ark., 2014). Trichler ve ark. (2014) platelet proteom çalışmalarına bir altyapı sağlamak adına sağlıklı 3 adet köpekten platelet izolasyonu ve proteomik analiz gerçekleştirmişler; toplam 5.974 adet protein elde edebilmişlerdir. Bu

proteinlerin 250 adeti daha önce köpekler için tanımlanan proteinlerle birebir eşleştirilirken, kalan büyük kısım için “tahmin edilen proteinler” tanımlaması yapılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada ve Trichler ve ark. (2014)’nin yaptığı araştırmada saptanan protein sayılarındaki farklılık (sırasıyla 1.703 ve 5.974); kullanılan teknoloji farklılığı kadar protein tespitlerinin bugüne kadar tanımlanan (reviewed proteins – [www.uniprot.org/swiss-prot.org](http://www.uniprot.org/swiss-prot.org)) ya da henüz tanımlanmayan proteinlere göre (un-reviewed proteins) yapılmasından ileri gelebilir.

Bu çalışmada kontrol grubu değerler ile karşılaştırıldığında test grubunda bazı proteinlerde artma (n=4), bazı proteinlerde de azalma (n=6) saptanmıştır. Test grubunda artan proteinler guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (GBP), apolipoprotein C-III (ApoC-III), apolipoprotein A-II (ApoA-II) ve clusterin, azalan proteinler de C-X-C motif chemokine 10 (CXC10), cytochrome C oxidase subunit 2 (COX2), cathepsin D, serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PPP1C), creatine kinase B-type (CKB) ve myotrophin olarak belirlenmiştir. Bu proteinlerden bazılarının (ApoA-II, GBP, cathepsin D, COX2, CXC10, PPP1C ve CKB) Trichler ve ark. (2014)’nin sağlıklı köpeklerden elde ettiği protein listesinde yer aldığı dikkat çekmiş, bazılarının da (ApoC-III ve myotrophin) ilk olarak bu çalışma ile köpek plateletlerdeki varlığı ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışmada plateletlerden elde edilen bazı proteinlerin (ApoA-1, ApoC-II, clusterin, beta-2-glikoprotein-1, hemoglobin subunit, plasminojen ve Ig heavy chain) Kocatürk ve ark. (2016)’nin DCM’li köpek serumlarında elde ettiği proteinlerle benzerlik göstermesi; platelet proteinlerinin dolaşıma geçme potansiyellerini ve sistemik etkiler oluşturabilme kabiliyetlerini destekler niteliktedir. Bilic ve ark. (2018)’nin idiopatik DCM’li köpek serumlarında bu çalışmada plateletlerden elde edilen proteinlere benzer olarak ApoA-I, ApoA-IV, ApoC-III ve Ig heavy chain belirlemeleri; apolipoproteinlerin platelet ve serumda varoluşları kadar DCM patofizyolojisinde oynadıkları rollere de önemli katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmada bu proteinlerin rektom analizi ile birbirileri ile olan ilişkileri irdelendiğinde ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)); hemostazis, gen ekspresyonu, signal transdüksiyonu, immun sistem, DNA tamiri, protein metabolizması, hücreler arası bağlantı, kas kontraksiyonu, programlı hücre ölümleri (apoptosis), ekstrasellüler

matriks ve kromatin organizasyonları ve eksternal uyarılara hücresele yanıt oluşturmada bireysel olarak ya da protein – protein etkileşimi ile görev aldıkları ortaya konmuştur. Moleküler olarak öncelikli görevlerin bağlayıcı (binding) ve katalitik aktivite olduğu, biyolojik olarak da sellüler ve metabolik proseslerde rol aldıkları görülmektedir. Plateletlerdeki lokalizasyonların; hücresele, ekstrasellüler bölge, makromoleküler kompleks, membran ve organel kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan proteinlerin görev aldıkları yollar irdelendiğinde (pathway analizi); kemokin ve sitokin aracılı inflamasyon yolağı, alfa adrenerjik reseptör aracılı ve endotelin sinyal yolları ile Wnt sinyal yolağı dikkat çekici bulunmuştur. Bu çalışmada tespit edilen proteinlerin öncelikli olarak kalsiyum bağlayan proteinler, enzim modülatörleri, hidrolaz, oksidoreduktaz, transfer ve taşıyıcı proteinler olduğu söylenebilir. Bu bulgular köpeklerde kalp yetmezliğinde bu proteinlerin plateletlerin farklı bölgelerinden (membran, organel) köken alabildiğini, platelet proteinlerinin sahip olduğu zengin ve karmaşık protein ağını, moleküler ve biyolojik görevlerini yaparken de bir çok mekanizmayı (yolak) kullanabildiklerini göstermiştir.

Bu çalışmada platelet proteini olarak GBP subunit alpha-11 sağlıklı kontrol köpekleri ile karşılaştırıldığında kalp yetmezlikli köpeklerde 2,07 kat artış göstermiştir. Bu çalışmada GBP'lerle ilgili farklı fragmentler de (gamma-T2, G(i) ve G(s) alpha-2, subunit beta 1 ve beta-3 ile G(q) ve G(t) subunit alpha) tespit edilmiştir. Kısaca “G proteini” olarak adlandırılan bu proteinlerin uniprot gen data bankasındaki fonksiyonlarına bakıldığında; adenilat siklazın hormonal regülasyonunda, hücre bölünmesinde, hücre içi sinyalizasyon ve modülasyon sistemlerinde görev aldığı belirtilmektedir. Wang ve ark. (2018) G-proteinlerin kalp fonksiyonlarının düzenlenmesinde merkezi fizyolojik rol oynadığını ve böylece ilaçlarla hedeflenen en büyük yüzey reseptör sınıfını temsil ettiğini bildirmişlerdir. Kalpteki G proteinleri adenilat siklaz içeren reseptörler ile eşleşerek nörohumoral sinyallerle kardiyak kontraktilitenin düzenlenmesine katılmaktadırlar. Kardiyomiyopati insanlarda G proteinin fonksiyonel aktivitesi artarken, adenilat siklaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Fieldman ve ark, 1990). Bu nedenle bu çalışmada platelet G proteininde saptadığımız artış; köpeklerde kalp yetmezliğinde azalan adenilat siklaz aktivitesi ile ilişkilendirilebilir. Dolayısıyla bu çalışmada platelet G proteinlerindeki artma; test grubu köpeklerde kalp kasında meydana gelen

fonksiyon kaybı ve bozulan enerji metabolizmasına karşı vücudun geliştirdiği koruyucu bir yanıt olarak düşünülebilir. Prasad ve ark. (2018) da bu proteinleri kardiyovasküler sistemin homeostatik düzenlemesinde rol alan adrenerjik reseptörlerden olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada da anjiyotensin-II'nin adrenal korteks reseptörlerine bağlanmasının G proteinleri tarafından modüle edildiği gösterilmiştir (Crawford ve ark., 1992). Bu bilgiler ışığında G proteinlerinin bir çok alt ünitelerinin olduğu ve hepsinin farklı sinyalizasyon ve inhibisyon sistemlerinde rol aldığı açıkça anlaşılmış; kontrol örneklerine göre kalp yetmezliği olan köpeklerdeki artışların bir diğer nedeninin renin – angiotensin - aldesteron sisteminin (RAAS) aktivasyonu olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada kontrollere göre hasta grubunda belirgin artış gösteren bir diğer platelet proteini ApoC-III olmuştur. Bu proteinin fizyolojik fonksiyonlarına bakıldığında; plazmadaki düşük (VLDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) komponenti olmakla birlikte trigliserit homeostasında çok yönlü rollerinden bahsedilmektedir. Roura ve ark. (2018) DCM'li insanlarda serum proteomlarını incelemişler; ApoC-III'ün de bulunduğu proteomlarda kontrollere göre önemli düzeyde artış tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada (Roura ve ark., 2018) ApoC-III'ün gelecekte DCM'de olduğu gibi hastalık spesifik biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir.

ApoC-III plazma trigliseritleri ve inflamasyon gibi kardiyovasküler risk faktörlerinin modülatörüdür. Çalışmalar ApoC-III düzeylerindeki değişikliklerin lipoproteinlerin aterojenite ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi olduğunu göstermektedir. Bu proteinin HDL, intestinal trigliserit trafiği ve pankreatik B hücrelerinin modülasyonunda rol oynaması; ApoC-III'ü kardiyovasküler hastalıkların yönetimi ve önlenmesi için önemli bir terapötik hedef haline getirmektedir (Kohan, 2015). Oliveri ve ark. (2010) insanlarda ApoC-III'ü kalp hastaları için trombojenik bir faktör olarak tanımlamışlar, olası nedenleri olarak da plazma endojen trombin oluşumu ve koagülasyon kaskadı ile kompleks etkileşimleri göstermişlerdir. Bu bilgiler çalışma sonuçlarımızla birleştirildiğinde ApoC-III'ün köpeklerde kalp yetmezliğinde lipid ve trigliserid metabolizmasını yöneterek aterojenik, koagülasyon kaskadını aktive ederek de trombotik etkiler yaratabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada ApoA-II kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında test grubunda anlamlı derecede artış gösteren proteinlerden biri olmuştur. HDL'nin major proteinlerinden olan ApoA-II'nin ateroskleroz gelişimini inhibe etmek için reverse kolesterol transportunu kontrol ettiği tespit edilmiştir (Tailleux ve ark., 2002). Baruch ve ark. (1984) HDL-kolesterol konsantrasyonu ve tromboz riski arasında negatif korelasyon tespit etmişlerdir. Lipoproteinler kolesterol taşınmasındaki rollerine ek olarak plateletler, koagülasyon kaskadı ve vasküler endotelyum ile etkileşime girmektedirler. HDL'nin antitrombotik etkileri; NO ve PGI2'nin endotelial üretiminin uyarılarak pıhtılaşma kaskadının inhibisyonu ve pıhtı fibrinolizinin uyarılması ile ilgilidir (Baruch ve ark., 1984). Dolayısı ile bu çalışmada test grubu köpeklerde platelet ApoA-II düzeylerinin yükselmesi; kalp yetmezliğinde trombotik etkilerin inhibe edilmesi ve fibrinolitik mekanizmaların (tertiyer hemostazis) korunması adına fizyopatolojik bir yanıt olarak düşünülebilir.

Corsetti ve ark. (2012) ApoA-II'nin yüksek HDL-kolesterol ve C-reaktif protein (CRP) düzeylerine sahip kadınlarda ApoE ile ilişkili kardiyovasküler hastalık riskinde önemli bir rol oynadığını, Remaley (2013) de yüksek-yağ diyetindeki tavşanların serum CRP seviyelerinde ve nötrofil sayılarında kontrol tavşanlarına kıyasla çarpıcı bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bilgiler temelinde bu çalışmada test grubunda platelet ApoA-II düzeylerindeki artma; kalp yetmezliğinde inflamatuvar sürecin (total lökosit ve nötrofil artışları) baskılanması adına anti-inflamatuvar etkiler ile ilişkilendirilebilir.

Platelet clusterin düzeyi kontrollere göre test grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermiştir. Protein veri bankasına (Uniprot) göre clusterin'in kan plazma proteinlerinin strese bağlı agregasyonunu önlediği, salgıladığında apoptosise karşı hücreleri koruduğu ancak çekirdekte bulunduğu apoptosisi teşvik ettiği ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol aldığı belirtilmektedir. Koller ve ark. (2017) kronik kalp yetmezliği hastalarında clusterin düzeyindeki azalmanın sürekli tüketime bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın aksine Turkieh ve ark. (2018) ratlarda kronik kalp yetmezliği ile ilgili olarak dolaşımdaki clusterin seviyelerinin ölenlerde hayatta kalanlara oranla artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Sunduğumuz bu çalışmada test grubu köpeklerde clusterin düzeyindeki artışın miyokardiyal hasarın giderilmesine yönelik sitoprotektif bir reaksiyon olduğu (Koller

ve ark., 2017) düşünülmüştür. Çalışmalar arasında clusterin düzeyleri üzerine farklı tespitler yapılmasında; tür farklılığı (insan, rat ve köpek) kadar kalp yetmezliğinin süresi ve şiddetinin de etkin olabileceği (Turkieh ve ark., 2018) kanısındayız.

Bu çalışmada test grubunda platelet proteinlerinden CXC10'un kontrol grubuna göre dramatik şekilde azalması; Borne ve ark. (2014)'nin miyokardiyal infarktüsli farelerde bu proteinin kontrollere göre azaldığını gösterdikleri çalışmaya benzerlik göstermiştir. CXC10 proteini; lökositler ve doku hücreleri tarafından salgılanıp endotelial ve vasküler düz kas hücreleri üzerinde etkili olmaktadır. CXC10 ile ilgili olarak aterosklerotik plaklardaki varlığı (anjiostatik) ile birlikte anti-fibrotik özelliklerinden de bahsedilmektedir (Mach ve ark., 1999; Shiraha ve ark., 1995). Bu nedenlerle test grubunda CXC10 protein düzeylerinin azalması; kalp yetmezliği sürecinde bu proteinin lökositler için kemokin işlevleri sırasında (lökosit trafiğinin düzenlemesi) ve fibrinolitik (tertiyer hemostazis) özelliklerinden dolayı aşırı kullanılmasından kaynaklanabilir. Çalışmalar temelinde (Borne ve ark., 2014) köpeklerde kalp yetmezliğinde CXC10'daki azalmanın kötü prognozla ilgili olduğu düşünülmüştür.

COX proteini mitokondriyal gen tarafından kodlanmakta ve 13 alt birimden oluşmaktadır. Bunlardan COX-I ve COX-II'nin ana katalitik bileşenler olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada sağlıklı ve hasta (kalp yetmezlikli) köpeklerde ortak olarak bulunan ve istatistiksel farklılık gösteren proteinlerden biri de COX-II (oksijenin suya indirgenmesini katalize eden solunum zinciri bileşeni) olmuştur. Kalp yetmezliği şekillenen hastalarda COX'ların oksidatif stres ile mutasyona uğradığı ve apoptozisi şiddetlendirdiği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2009). Septik hastalarda sağ kalanlarda platelet COX aktivitelerinin yüksek olduğu, COX'un düşük olduğu hastalarda ise mitokondriyal fonksiyon arttırıcı ilaçların faydalı olabileceği bildirilmiştir (Lorente ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmada test grubunda platelet COX-II proteininin azalması; kalp yetmezlikli köpeklerde miyokardiyal hasarla mutasyona uğraması ve oksidatif stres ilişkili apoptozis süreçlerinde aşırı kullanılması ile ilgili olabilir. Kalp yetmezliğinde klinik olarak egzersiz intoleransının ortaya çıkmasında COX-II'deki bu değişimlerin etkili olduğu düşünülmektedir (Diaz, 2009).

Cathepsinlerin intraselüler protein yıkımı, nörolojik bozukluk, kanser ve kardiyomiyopati gibi hastalıkların sinyal yollarında görevleri tanımlanmıştır. Cathepsin proteinin 12 fragmentinden (B, C, D, F, H, K, L, O, S, V, X ve W) bahsedilmektedir (Blondelle ve ark., 2015). Bu çalışmada kalp yetmezliği saptanan köpeklerde kontrole göre azalan bir diğer protein ve fragmenti Cathepsin D olarak belirlenmiştir. Bu bulgumuzun aksine Blondelle ve ark. (2015) cathepsin D'nin miyokardiyal infarktüsü takiben plazma seviyesinde artış tespit etmişlerdir. Yamac ve ark. (2015)'nin Cathepsin D seviyelerini akut miyokardiyal infarktüslerde yüksek saptamaları çalışma sonuçlarımıza tezat oluştururken, kronik kalp hastalarında düşük seviyelerde bulmaları ise benzerlik göstermiştir. Dolayısıyla bu çalışmada cathepsin D'deki azalmanın olası neden(ler)i; çalışmamıza dahil edilen köpeklerin kronik süreçteki kalp yetmezliğine sahip olmaları ve kardiyak yeniden şekillenme (remodeling) esnasında aşırı kullanımları olabilir. Bu tespitler ayrıca köpeklerde akut ve kronik kalp yetmezliklerinde serum ve platelet cathepsin D değişimlerini ortaya çıkaracak çalışmalara olan gereksinimi de göstermektedir.

Bu çalışmada kontrole göre test grubunda azalan diğer proteinler CKB ve PPP1C olmuştur. CKB proteini; iskelet kası, kalp, beyin ve sperm gibi altyapılarında enerji ihtiyacı olan doku ve oluşumlarda enerji transdüksiyonunun yönetiminde merkezi bir rol oynamaktadır. CKB'nin insan plateletlerinde yüksek oranda eksprese edilmesinin otozomal bir hastalıkla ilişkili olduğu kanısına varılması (Arnold ve ark., 2012), bu proteinin farklı hastalıkların altyapılarında görev alabileceğini düşündürmektedir. PPP1C proteini ile ilgili olarak glikojen metabolizması, kas kontraktilesi ve protein sentezindeki rollerinden bahsedilmektedir. Bu çalışmamızda kalp yetmezlikli köpeklerde CKB ve PPP1C düzeylerinin azalması; hastalık sürecinde bu proteinin enerji transdüksiyonu ve glikojen metabolizmasını düzenlerken aşırı kullanılmaları ile ilgili olabilir.

Myotrophin aktin filamentlerin şekilsel düzenlenmesinde rol oynayan ve kardiyak kas hipertrofisini teşvik eden bir proteindir. Farelerde yapılan bir çalışma (Das ve ark., 2010); myotropin ve p53 geni arasındaki ilişkiyi ortaya koymuş, aşırı myotrophin ekspresyonunun da kalp yetmezliği oluşumunda aktif rol aldığını göstermiştir. Aynı çalışmada (Das ve ark., 2010) p53 inhibisyonu ile kardiyak hipertrofinin kalp yetmezliğine dönüşümünün engellenebileceği öngörülmüştür.



Kadınlara göre erkeklerde daha belirgin aktivite gösteren myotropinin; kalp yetmezliğinde erken aktivasyon gösteren proteinlerden olduğu (biyobelirteç) ve hastalığın şiddetinin artmasıyla sistemik yanıtının azaldığı rapor edilmiştir (O'Brien ve ark., 2003). Sunulan bu çalışmada platelet myotrophin aktivitesinin kronik kalp yetmezliği şekillenen köpeklerde sağlıklı köpeklere göre azalması; kardiyomiyosit ve aktin filamentlerinde meydana gelen geometrik ve fonksiyonel değişimlerde (cardiac re-modeling) adı geçen proteinin tüketilme potansiyeli ile ilgili olabilir.

Bu çalışmada evcil köpek ailesi için tanımlanan 107 protein içinden, istatistiksel anlamı olmayan (Anova  $P > 0,05$  ve power  $> 0,5$ ) ancak kontrole göre dramatik farklılık gösteren proteinlerin varlığı dikkat çekici bulunmuştur: ApoC-II (19,7 kat), lysozyme C spleen isoenzyme (4,4 kat), matrix metalloproteinase-9 (2,9 kat), ras related protein rab-13 (2,3 kat), ApoA-I (2,1 kat) ve beta-2-glycoprotein-1 (1,9 kat). Halen insan ve köpeklerde kardiyak serum biyobelirteci olarak kullanılan cTnI düzeyindeki minör artışlar (köpek referans  $< 0,07$  ng/mL) nasıl kardiyomiyosit hasarını gösteriyorsa; bu çalışmamızda elde edilen proteinlerdeki 2 kat ve üzeri artışlar önemli biyobelirteç potansiyeli olarak düşünülebilir. Matriks metalloproteinase'ların ventriküllerin dilatasyon ve distorsiyonunda rol oynamaları (Wendy, 2011), plateletlerin kalp yetmezliği patofizyolojisinde aldığı ve alabileceği rolleri çeşitlendirmektedir.

Plateletler sayı ve fonksiyon olarak hemostazis sürecinde (primer ve sekonder) önemli rol oynamaktadırlar. Bu çalışmada sağlıklı ve hasta gruplarında ortak olarak bulunan proteinler içinde beta-2-glycoprotein-1, platelet glycoprotein Ib alpha chain, fibrinogen beta ve alpha chain ile plasminojenin belirlenmesi köpeklerde hemostazis patofizyolojisinde bu proteinlerin varlığı ve görev tanımlamalarını daha da güçlendirmiştir. Daha önceki bilgiler primer hemostazis sürecinde fibronectin'in damar endotelinden salınıp plazmada bulunduğunu gösterirken (Atalan, 2013; Reece, 2003a; Tutar ve ark., 2000), bu çalışma plateletlerden de kaynaklanabileceğini göstermiştir. Ancak, Wilkerson ve Shuman (2001)'in çalışmasına göre plateletlerden izole edilen fibronectin, immunglobulin, fibrinojen ve albümin gibi proteinler; aslında plateletlerin primer proteini olmayıp kanikuler sitemleri aracılığı ile plazmadan alfa granüllerine aldıkları ve depoladıkları proteinlerdir.

Bu çalışmada anlamlı değişim gösteren 10 adet proteinin birbiri ile olan ilgisi irdelendiğinde (string analizi); özellikle COX proteinleri (COX-I, -II ve -III) ve apolipoproteinler (ApoA-I, -II ve -III) arasında moleküler, fonksiyonel ve enzimatik reaksiyonlar anlamında etkileşim olduğu fark edilmiştir. Çalışmadan elde edilen tüm platelet proteinlerinin protein interaksiyonlarında RAB, Apo ve MMP'lerin sentral önemde olduğu dikkat çekmiştir. Protein bankalarına bu proteinler ile ilgili yeni görevler eklendikçe proteinlerin birbiri ile olan biyolojik bağlarının daha da çeşitleneceği söylenebilir. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular temelinde:

- 1- Plateletlerin sadece primer hemostazis'ten sorumlu olmadıkları,
- 2- Plateletlerden birçok proteinin köken aldığı, bu proteinlerin koagülasyon dengesini de içeren çeşitli metabolik ve biyolojik olaylarda görev aldığı,
- 3- Kalp yetmezlikli köpeklerde guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (GBP), apolipoprotein C-III (ApoC-III), apolipoprotein A-II (ApoA-II) ve clusterin düzeylerinin arttığı,
- 4- Kalp yetmezlikli köpeklerde C-X-C motif chemokine 10 (CXC10), cytochrome C oxidase subunit 2 (COX2), cathepsin D, serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PPP1C), creatine kinase B-type (CKB) ve myotrophin düzeylerinin azaldığı,
- 5- Anlamlı değişim gösteren her bir platelet proteinin kalp yetmezliği sürecinde potansiyel biyobelirteç olabileceği
- 6- Kalp yetmezliğinde geometrik ve fonksiyonel değişimlerde (cardiac re-modeling) platelet proteinlerin rol oynayabileceği,
- 7- Global pıhtılaşma sürelerinin (PT ve aPTT) hiperkoagülasyon durumunu ortaya koymada geleneksel TEG parametreleri kadar hassas olmadığı ve
- 8- TEG V-curve verilerinin kalp yetmezliğinde trombin oluşumu ve fibrinolitik sistemdeki bozulmayı detaylandırabildiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen platelet proteinleri ve görevleri temelinde kalp yetmezliği patofizyolojisinin detaylandırıldığı söylenebilir. Bu proteinlerin tanı ve prognoz belirlemede kullanışlı biyobelirteçler olabilmesi için yeni ve kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği kanısındayız. İleride yapılacak çalışmalarla kalp yetmezliği için bu proteinler hedef alınarak spesifik tedavi ve profilaksi geliştirmek de mümkün olabilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Abbot JA (2016) Acquired Valvular Heart Diseases. Editor: Smith Jr FWK, Tilley LP, Oyama MA, Sleeper MM, Manuel Of Canine and Feline Cardiology. 5th edition, Elsevier Press, Missouri, pp: 111.
2. Alvarez AM, Mukherjee D (2011) Liver abnormalities in cardiac diseases and heart failure. *International Journal of Angiology* 20(3): 135-142.
3. Arab S, Gramolini AO, Ping P et al (2006) Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications. *Journal of American Collage Cardiology* 48(9): 1733-1741.
4. Arnold H, Wienker TF, Hoffman MM et al (2012) High levels of brain-type creatine kinase activity in human platelets and leukocytes: a genetic anomaly with autosomal dominant inheritance. *Blood Cells Molecules and Diseases* 48(1): 62-67.
5. Arslan D, Cimen D, Guvenc O et al (2013) Platelet distribution width and mean platelet volume in children with pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease with left-to-right shunt: new indices of severity? *Pediatric Cardiology* 34(4): 1013-1016.
6. Atalan N (2013) Hemostaz, Göğüs Kalp Damar ve Anestezi Dergisi 19(3): 109-112.
7. Atamer T (2007) Hemostaz Mekanizması. *Türk Hematoloji Derneği Temel Hemostaz Tromboz Kursu*, s: 7-11.
8. Audu P, Nielsen VG, Armstead V et al (2006) The impact of tissue factor pathway inhibitor on coagulation kinetics determined by thrombelastography. *Anesthesia and Analgesia* 103(4): 841-845.
9. Aziz F, Tk LA, Enweluzo C et al (2013) Diastolic heart failure: a concise review. *Journal of Clinical Medicine Research* 5(5): 327-334.
10. Baisan RA, Bîrsan O, Vulpe V (2016) Electrocardiographic changes in chronic valvular disease and dilated cardiomyopathy in dog. *Human and Veterinary Medicine-Bioflux*, 8(2): 98-102.
11. Bakirel U, Gunes S (2009) Value of cardiac markers in dogs with chronic mitral valve disease. *Acta Veterinaria (Beograd)* (59)2-3: 223-229.
12. Banfi C, Brioschi M, Marenzi G et al (2010) Proteome of platelets in patients with coronary artery disease. *Experimental Hematology* 38: 341– 350.
13. Baruch Y, Brook JG, Eidelman S (1984) Increased concentration of high density lipoprotein in plasma and decreased platelet aggregation in primary biliary cirrhosis. *Atherosclerosis* 53(2): 151-162.
14. Başaran E, Aras S, Cansaran-Duman D (2010) Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 67(2): 85-96.
15. Basoglu A, Baspinar N, Tenuri L et al (2014) Nmr based metabolomics evaluation in neonatal calves with acute diarrhea and suspected sepsis: a new approach for biomarker/s. *Metabolomics* 4: 2.

16. Bauer N, Eralp O, Moritz A (2009) Establishment of reference intervals for kaolin-activated thromboelastography in dogs including an assessment of the effects of sex and anticoagulant use. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 21: 641-648.
17. Beier P, Reese S, Holler PJ et al (2014) The role of hypothyroidism in the etiology and progression of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29(1): 141-149.
18. Berhane BT, Zong C, Liem DA et al (2005) Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the hupo plasma proteome project pilot phase. *Proteomics* 5: 3520-3530.
19. Bilic P, Guillemin N, Kovacevic A et al (2018) Serum proteome profiling in canine idiopathic dilated cardiomyopathy using TMT-based quantitative proteomics approach. *Journal of Proteomics* 179: 110-121.
20. Birner C, Dietl A, Deutzmann R et al (2012) Proteomic profiling implies mitochondrial dysfunction in tachycardia-induced heart failure. *Journal of Cardiac Failure* 8: 660-673.
21. Blondelle J, Lange S, Greenberg BH (2015) Cathepsins in heart disease—chewing on the heartache? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 308(9): 974–976.
22. Boon JA (2011) *Veterinary Echocardiography*, 2nd edition, Wiley-Blackwell Press, USA, pp: 25-556.
23. Borne Pvd, Quax PHA, Hoefler IE et al (2014) The multifaceted functions of cxcl10 in cardiovascular disease. *Hindawi publishing corporation biomed research international* 893106.
24. Boswood A, Häggström J, Gordon SG et al (2016) Effect of pimobendan in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease and cardiomegaly: the epic study: a randomized clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30(6): 1765-1779.
25. Brady CA, Hughes D, Drobatz KJ (2004) Association of hyponatremia and hyperglycemia with outcome in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 14(3): 177-182.
26. Brewer R, Wang M, Zhang K et al (2012) A canine model of chronic heart failure and renal insufficiency (cardiorenal syndrome). *Journal of The American College Of Cardiology* 59(13): E969.
27. Buchanan JW (1999) Prevalence of cardiovascular disorders. Editor: Fox PR, Sisson D, Moise NS, *Textbook of Canine and Feline Cardiology: Principles and Clinical Practice*. 2nd edition, WB Saunders, Philadelphia, pp: 457-470.
28. Burkhart JM, Gambaryan S, Stephen P et al (2014) What can proteomics tell us about platelets? *Circulation Research* 114: 1204-1219.
29. Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S et al (2012) The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 120(15): 73-82.
30. Buscemi N, Murray C, Doherty-Kirby A et al (2005) Myocardial subproteomic analysis of a constitutively active rac1-expressing transgenic mouse with lethal myocardial hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart Circulatory Physiology* 289: 2325-2333.

31. Çakıroğlu D, Meral Y, Bakirel U et al (2009) Cardiac troponin levels in dogs with dilated cardiomyopathy. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15: 13-17.
32. Ceciliani F, Eckersall D, Burchmore R et al (2014) Proteomics in veterinary medicine: applications and trends in disease pathogenesis and diagnostics. *Veterinary Pathology* 51(2): 351-362.
33. Cevik O, Baykal AT, Sener A (2016) Platelets proteomic profiles of acute ischemic stroke patients. *Plos One* 11(6): e0158287.
34. Chatterjee K, Rame JE (2008) Systolic heart failure: chronic and acute syndromes. *Critical Care Medicine* 36: 44-51.
35. Chu SG, Becker RC, Berger PB et al (2010) Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis Haemostasis* 8(1): 148-156.
36. Çolakoğlu EÇ, Alihosseini H, Haydardedeoglu AE (2018) Hipertrofik kardiyomyopatili kedilerde trombosit ve ortalama trombosit hacmi düzeyleri erken emboli oluşumunu belirlemede kullanılabilir mi? *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 7(1): 84-88.
37. Corsetti JP, Bakker SJ, Sparks CE et al (2012) Apolipoprotein A- II influences apolipoprotein E-linked cardiovascular disease risk in women with high levels of HDL cholesterol and C-reactive protein. *Plos One* 7(6): 39110.
38. Crawford KW, Frey EA, Cote TE (1992) Angiotensin II receptor recognized by DuP753 regulates two distinct guanine nucleotide-binding protein signaling pathways. *Molecular Pharmacology* 41(1): 154-162.
39. Das B, Young D, VasANJI A et al (2010) Influence of p53 in the transition of myotrophin-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Cardiovascular Research* 87(3): 524-534.
40. Demirel DÖ (2008), *Tıpta Proteomik Analiz*, [http://Biotek.Ankara.Edu.Tr/Duyurular/Tipta Proteomiks.pdf](http://Biotek.Ankara.Edu.Tr/Duyurular/Tipta%20Proteomiks.pdf), (19.06.2018).
41. Diaz F (2010) Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802: 100–110.
42. Domanjko PA, Lukman T, Verk B et al (2018) Systemic inflammation in dogs with advanced-stage heart failure. *Acta Veterinaria Scandinavica* 60(1): 20.
43. Dukes-Mcewan J, Borgarelli M, Tidholm A et al (2003) Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Cardiology* 5(2): 7-19.
44. Engelen C, Moritz A, Barthel F et al (2017) Preliminary reference intervals and the impact of citrate storage time for thromboelastography in cats including delta and the velocity curve. *BMC Veterinary Research* 13: 366.
45. Eralp O, Yilmaz Z, Failing K et al (2011) Effect of experimental endotoxemia on thromboelastography parameters, secondary and tertiary hemostasis in dogs. *Journal of Veterinary Science* 25: 524-531.
46. Eralp-Inan O, Kocatürk M, Mecitoglu Z et al (2016) Thromboelastographic evaluation of coagulation in a dog with anticoagulant rodenticide intoxication. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine Kafkas University* 22(3): 477-478.

47. Fieldman AM, Jackson DG, Michael R et al (1991) Immunodetectable levels of the inhibitory guanine nucleotide- binding regulatory proteins in failing human heart: discordance with measurements of adenylate cyclase activity and levels of pertussis toxin substrate. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 23(4): 439-452.
48. Fujita S, Takeda Y, Kizawa S et al (2015) Platelet volume indices are associated with systolic and diastolic cardiac dysfunction, and left ventricular hypertrophy. *BMC Cardiovascular Disorders* 15: 52.
49. Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA (2002) *Hurst's The Heart*, Çeviren: Uzm. Dr. Arif Nihat Dursun, Cilt 2, 10.Baskı, AND Yayıncılık, İstanbul, s: 656-679.
50. Gale AJ (2011) Current understanding of hemostasis. *Toxicologic Pathology* 39(1): 273–280.
51. Ghoshal K, Bhattacharyya M (2014) Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal* 781857.
52. Gordon SG, Saunders AB, Wesselowski SR (2017) Asymptomatic canine degenerative valve disease: current and future therapies. *Veterinary Clinics Small Animal Practise* 47: 955–975.
53. Goutal CM, Keir I, Kenney S et al (2010) Evaluation of acute congestive heart failure in dogs and cats: 145 cases (2007-2008). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)* 20(3): 330-337.
54. Groenveld HF, Januzzi JL, Damman K, et al (2008) Anemia and mortality in heart failure patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Collage of Cardiology* 52: 818–827.
55. Guglielmini C, Poser H, Pria AD et al (2013) Red blood cell distribution width in dogs with chronic degenerative valvular disease. *Journal of The American Veterinary Medicine Association* 243(6): 858-862.
56. Haas B, Serchi T, Wagner DR et al (2011) Proteomic analysis of plasma samples from patients with acute myocardial infarction identifies haptoglobin as a potential prognostic biomarker. *Journal of Proteomics*. 75(1): 229-236.
57. Hamilton-Elliott J, Ambrose E, Christley R et al (2018) White blood cell differentials in dogs with congestive heart failure (CHF) in comparison to those in dogs without cardiac disease. *Journal of Small Animal Practise* 59(6): 364-372.
58. Han D, Choi R, Hyun C (2015) Canine pancreatic- specific lipase concentration in dogs with heart failure and chronic mitral valvular insufficiency. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29(1): 180-183.

59. Hinkelbein J, Feldmann RE, Schubert C et al (2009) Alterations in rat serum proteome and metabolome as putative disease markers in sepsis. *Journal of Trauma* 66(4): 1065-1075.
60. Hobson AR, Agarwala RA, Swallow RA et al (2006) Thrombelastography: current clinical applications and its potential role in interventional cardiology. *Platelet* 17(8): 509-518.
61. Holler PJ, Wess G (2013) Sphericity index and E-point-to-septal-separation (EPSS) to diagnose dilated cardiomyopathy in doberman pinchers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28(1): 123-129.
62. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK et al (2000) ABC of heart failure. *Pathophysiology. British Medical Journal* 320(7228): 167–170.
63. Jiang CF, Ng KW, Tan SW et al (2002) Serum levels of amylase and lipase in various stages of chronic renal insufficiency. *Chinese Medical Journal* 65(2): 49-54.
64. Kalenka A, Fieldmann RE, Otero K et al (2006) Changes in the serum proteome of patients with sepsis and septic shock. *Anesthesia and Analgesia* 103(6): 1522-1526.
65. Karlopudi SK, Srikala D, Rao DST (2012) Hypothyroidism – A cause for dilated cardiomyopathy in dogs; four year study (2008 – 2011). *Veterinary World* 5(12): 742-747.
66. Karvunidis, T, Mares J, Thongboonkerd V et al (2009) Recent progress of proteomics in critical illness. *Shock* 31(6): 545-552.
67. Kell DB, Pretorius E (2015) The simultaneous occurrence of both hypercoagulability and hypofibrinolysis in blood and serum during systemic inflammation, and the roles of iron and fibrin(ogen). *Integrative Biology* 7(1): 24-52.
68. Kemp CD, Conte JV (2012) The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Pathology* 21(5): 365-371.
69. Khandekar MM, Khurana AS, Deshmukh SD et al (2006) Platelet volume indices in patients with coronary artery disease and acute myocardial infarction: an Indian scenario. *Journal of Clinical Pathology* 59(2): 146-149.
70. Kim HN, Januzzi JL Jr (2011) Natriuretic peptide testing in heart failure. *Circulation* 123(18): 2015-2019.
71. Kim HT, Han SM, Song WJ et al (2017) Retrospective study of degenerative mitral valve disease in small-breed dogs: survival and prognostic variables. *Journal of Veterinary Science* 18(3): 369-376.
72. Kittleson MD (2018) Merck Veterinary Manual, <https://www.merckvetmanual.com/dog-owners/heart-and-blood-vessel-disorders-of-dogs/heart-failure-in-dogs>, (07.09.2018)
73. Kittleson MD (2018a) Merck Veterinary Manual, <https://www.merckvetmanual.com/circulatory-system/heart-disease-and-heart-failure/specific-cardiac-diseases>, (12.10.2018).
74. Kocatürk M, Baykal AT, Türkseven Ş et al (2016) Evaluation of serum and ascitic fluid proteomes in dogs with dilated cardiomyopathy. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 22(2): 273-279.

75. Kocaturk M, Eralp-Inan O, Levent P et al (2016) Protective effects of s -adenosylmethionine (same) and silybin on hepatorenal and hemostatic functions in dogs with endotoxemia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 40: 788-796.
76. Kocaturk M, Yilmaz Z, Eralp-Inan O et al (2017) Thromboelastographic evaluation of thrombus generation and fibrinolysis in dogs with parvoviral enteritis. 50th European Veterinary Conference, Voorjaarsdagen.
77. Kohan AB, Curr Opin (2015) Apolipoprotein C-III: a potent modulator of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Journal of Endocrinology Diabetes and Obesity* 22(2): 119-125.
78. Koller L, Richter B, Winter MP et al (2017) Clusterin/apolipoprotein J is independently associated with survival in patients with chronic heart failure. *Journal of Clinical Lipidology* (in press) 11(1): 178-184.
79. Lake-Bakaar GA, Johnson EG, Griffiths LG (2012) Aortic thrombosis in dogs: 31 cases (2000-2010). *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 241(7): 910-915.
80. Langhorn R, Willesen JL (2015) Cardiac troponins in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30(1): 36-50.
81. Linklater AKJ, Lichtenberger MK, Thamm DH et al (2007) Serum concentrations of cardiac troponin I and cardiac troponin T in dogs with class IV congestive heart failure due to mitral valve disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 17(3): 243–249.
82. Little WC, Kitzman DW, Cheng CP (2000) Diastolic dysfunction as a cause of exercise intolerance. *Heart Failure Reviews* 5: 301-306.
83. Lubas G, Caldin M, Wiinber B et al (2010) Laboratory testing of coagulation disorders. Editor: Weiss DJ, Wardrop KJ, Schalm's Veterinary Hematology. 6th edition, Wiley-Blackwell Press, USA, pp: 1082-1100.
84. Mach F, Sauty A, Larossi AS et al (1999) Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *Journal of Clinical Investigations* 104(8): 1041–1050.
85. Martin M, Corcoran B (1997) *Cardiorespiratory Diseases of the Dog And Cat*. Blackwell Science Press, London, pp: 73-74.
86. Morales M, Ynaraja E, Montoya JA (2001) Dilated cardiomyopathy in Presa canario dogs: ECG findings. *Journal of Veterinary Medicine a Physiology Pathology Clinical Medicine* 48(10): 577-580.
87. Nelson RW, Couto CG (2014) *Small Animal Internal Medicine*. 5th edition, Elsevier, Canada, pp: 53-143.
88. O'Brien RJ, Loke I, Davies JE et al (2003) Myotrophin in human heart failure. *Journal of the American Collage of Cardiology* 42(4): 719-725.
89. Olivieri O, Martinelli N, Girelli D, et al (2010) Apolipoprotein C-III predicts cardiovascular mortality in severe coronary artery disease and is associated with an enhanced plasma thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8: 463–471.
90. Oyama MA, Peddle GD, Reynolds CA et al (2011) Use of the loop diuretic torsemide in three dogs with advanced heart failure. *Journal of Veterinary Cardiology* 13(4): 287-292.
91. Oyama MA, Sisson DD (2004) Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18(6): 831-839.



92. Paltrinieri S, Sartorelli P, De Vecchi B et al (1998) Metabolic findings in the erythrocytes of cardiopathic and anaemic dogs. *Journal of Comparative Pathology* 118(2): 123-133.
93. Panciera DL, Refsal KR (1994) Thyroid function in dogs with spontaneous and induced congestive heart failure. *Canadian Journal of Veterinary Research* 58(3): 157-162.
94. Peddle GD, Singletary GE, Reynolds CA et al (2012) Effect of torsemide and furosemide on clinical, laboratory, radiographic and quality of life variables in dogs with heart failure secondary to mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology* 14(1): 253-259.
95. Porciello F, Rishniw M, Herndon WE et al (2008) Cardiac troponin I is elevated in dogs and cats with azotaemia renal failure and in dogs with non-cardiac systemic disease. *Australian Veterinary Journal* 86(10): 390-394.
96. Pouchelon JL, Atkins CE, Bussadori C et al (2015) Cardiovascular-renal axis disorders in the domestic dog and cat: a veterinary consensus statement. *Journal of Small Animal Practise* 56(9): 537-552.
97. Prasad SVN, Nienaber J, Rockman HA (2002) G-Protein-coupled receptor function in heart failure. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantative Biology* 67: 439-444.
98. Prihirunkit K, Sastravaha A, Lekcharoensuk C et al (2014) Hemostatic markers in congestive heart failure dogs with mitral valve disease. *Journal of Veterinary Medicine* 589873.
99. Reece WO, 2003a, *Dukes Veterinary Physiology (Dukes Veteriner Fizyoloji)*. Çeviren: YILDIZ S, cilt 1, 12. baskı, Medipress Baskı, İstanbul, s: 75-74.
100. Reece WO, 2003b, *Dukes Veterinary Physiology (Dukes Veteriner Fizyoloji)*, Çeviren: YILDIZ S, cilt 1, 12. baskı, Medipress Baskı, İstanbul, s: 353-354.
101. Remaley AT (2013) Apolipoprotein A-II still second fiddle in high-density lipoprotein metabolism? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 33: 166-167.
102. Roura S, Gámez-Valero A, Lupón J (2018) Proteomic signature of circulating extracellular vesicles in dilated cardiomyopathy. *Laboratory Investigations a Journal Of Technical Methods And Pathology* (in press). 98(10): 1291-1299.
103. Salooja N, Perry DJ (2001) Thrombelastography. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 12(5): 327-337.
104. Sasaki H, Asanuma H, Fujita M et al (2009) Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP activated protein kinase. *Circulation* 119(19): 2568-2577.
105. Sawicki G, Jugdutt BI (2004) Detection of regional changes in protein levels in the in vivo canine model of acute heart failure following ischemia-reperfusion injury: functional proteomics studies. *Proteomics* 4: 2195–2202.
106. Schober KE, Hart TM, Stern JA et al (2010) Detection of congestive heart failure in dogs by doppler echocardiography. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24(6): 1358-1368.
107. Shiraha H, Glading A, Gupta K et al (1999) IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity. *Journal of Cellular Biology* 146(1): 243-254.
108. Simpson S, Edwards J, Ferguson-Mignan TF et al (2015) Genetics of human and canine dilated cardiomyopathy. *International Journal of Genomics* 204823.

109. Smith Jr F, Tilley L, Oyama M et al (2016) Manual of Canine And Feline Cardiology, 5th edition, Saunders press, Missouri, pp: 250-472.
110. Stephan I, Nolte I, Hoppen HO (2003) The effects of hypothyroidism on cardiac function in dogs. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 110(6): 231-239.
111. Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC et al (2002) Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 164(1): 1-13.
112. Tang YD, Katz SD (2006) Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options. *Circulation* 113: 2454–2461.
113. Tarnow I, Falk T, Tidholm A et al (2007) Hemostatic biomarkers in dogs with chronic congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21(3): 451-457.
114. Tenenbaum A, Fisman EZ (2004) Impaired glucose metabolism in patients with heart failure: pathophysiology and possible treatment strategies. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 4(5): 269-280.
115. Testa M, Yeh M, Lee P et al (1996) Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *Journal of the American Collage of Cardiology* 28(4): 964-971.
116. Tong LJ (2017) Platelet indices and their association with chronic valvular heart disease in cavalier king charles spaniels. Murdoch University, <http://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/40806/2/Tong2017.pdf>
117. Trichler S, Bulla S, Mahajan N et al (2014) Identification of canine platelet proteins separated by differential detergent fractionation for nonelectrophoretic proteomics analyzed by gene ontology and pathways analysis. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 5: 1-9.
118. Turkieh A, Fertin M, Bouvet M et al (2018) Ezpression and implication of clusterin in left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation Heart Failure* 11(6): e004838.
119. Tutar E, Tokuç G, Öktem S (2000) Hemostaz. *Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi* 11(3): 946-949.
120. Urso C, Brucculeri S, Caimi G (2015) Acid–base and electrolyte abnormalities in heart failure: pathophysiology and implications. *Heart Failure Reviews* 20: 493–503.
121. Verma BR, Williams B, Honushefsky A et al (2016) The albumin globulin ratio in chronic heart failure-implications for mortality. *Journal of Cardiac Failure* 22(8): 30.
122. Vistnes M, Christensen G, Omland T (2010) Multiple cytokine biomarkers in heart failure. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 10(2): 147-157.
123. Vollmar AC (1999) Use of echocardiography in the diagnosis of dilated cardiomyopathy in irish wolfhounds. *Journal of the American Animal Hospital Association* 35: 279–283.
124. Vollmar AC, Fox PR (2016) Long-term outcome of irish wolfhound dogs with preclinical cardiomyopathy, atrial fibrillation, or both treated with pimobendan, benazepril hydrochloride, or methyl digoxin monotherapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30(2): 553-559.

125. Vörös K, Hetey C, Reiczigel J et al (2009) M-mode and two-dimensional echocardiographic reference values for three hungarian dog breeds: Hungarian vizsla, mudi and hungarian greyhound. *Acta Veterinaria Hungarica* 57(2): 217–227.
126. Wang J, Gareri C, Rockman HA (2018) G-protein–coupled receptors in heart disease. *Circulation Research* 123: 716–735.
127. Wendy WA (2011) *Cardiovascular Disease in Small Animal Medicine*. 3rd edition, Manson Publishing, London, pp: 164-188.
128. Wilkerson MJ, Shuman W (2001) Alterations in normal canine platelets during storage in EDTA anticoagulated blood. *Veterinary Clinical Pathology* 30: 107-113.
129. Willard MD, Tvedten H (2012) *Small Animal Clinical Diagnosis By Laboratory Methods*, Elsevier, Missouri, pp: 92-111.
130. Willingale R, Jones DJ, Lamb JH et al (2006) Searching for biomarkers of heart failure in the mass spectra of blood plasma. *Proteomics* 6(22): 5903-5914.
131. Winter RL, Sedacca CD, Adams A et al (2012) Aortic thrombosis in dogs: presentation, therapy, and outcome in 26 cases. *Journal of Veterinary Cardiology* 14(2): 333-342.
132. Wu C, Yan L, Depre C et al (2009) Cytochrome c oxidase III as a mechanism for apoptosis in heart failure following myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 297(4): 928–934.
133. Xue C, Zhang A, Sun H et al (2014) An improved ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight high-definition mass spectrometry method for determining ingredients of herbal *Fructus corni* in blood samples. *Pharmacognosy Magazine* 10(40): 422-429.
134. Yamac AH, Sevgili E, Kucukbuzcu S et al (2015) Role of cathepsin D activation in major adverse cardiovascular events and new-onset heart failure after STEMI. *Herz Kardiovaskulare Erkrankungen* 40(6): 912-920.
135. Yilmaz Z, Kocaturk M, Eralp-Inan O et al (2017) Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with dilated cardiomyopathy. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 41: 372-379.
136. Yu IB, Huang HP (2016) Prevalence and prognosis of anemia in dogs with degenerative mitral valve disease. *Biomed Research International* 4727054.
137. Zois NE, Moesgaard SG, Kjølgaard-Hansen M et al (2012) Circulating cytokine concentrations in dogs with different degrees of myxomatous mitral valve disease. *The Veterinary Journal* 192(1): 106-111.

## 7. SİMGE VE KISALTMALAR

µL	Mikrolitre
A	Amplitüd
ACD	Asit sitrat dekstroz
ACE-i	Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü
ACVIM	American Collage of Veterinary Internal Medicine
ADP	Adenozin difosfat
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin transferaz
ANP	Atrial natriüretik peptit
Ao	Aort
APO AII	Apolipoprotein A II
APO CIII	Apolipoprotein C III
aPTT	Aktive parsiyal tromboplastin zamanı
AST	Aspartat aminotransferaz
AT	Antitrombin
ATE	Arteriyel tromboembolizm
AT-III	Antitrombin 3
BNP	B tipi natriüretik peptit
BUN	Kan üre nitrojen
CA	Canlı ağırlık
CK	Kreatin kinaz
CKB	Kreatin kinaz b tipi
CK-MB	Kreatin kinaz MB
Cl	Koagülasyon indeksi
Cr	Kreatinin
CRP	C reaktif proteini
CTNI	Kardiyak troponin I
CVHD	Kronik valvüler kalp hastalığı
CW	Continous wave
DAP	Diyastolik arteriyel basınç
DCM	Dilate kardiyomiyopati
DIC	Dissemine intravasküler koagülasyon
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EF	Ejeksiyon fraksiyonu
EKG	Elektrokardiyografi
EPL	Lizisin 30 dk da gerçekleşme oranı
EPSS	E point septal seperasyon
ET	Ejeksiyon zamanı
FDP	Fibrin parçalanma ürünleri
FS	Fraksiyonel kısalma
G	MA nın logaritmik derivasyonu pıhtı sağlamlığı

GBP	Guanin bağlayıcı protein
HCT	Hematokrit
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HGB	Hemoglobin
IU/L	İnternasyonelünite / litre
IVSd	İnterventriküler septum- diyastol
IVSs	İnterventriküler septum- sistol
İv	İntravenöz
K	Potasyum
K süresi	Koagülasyon süresi
KDS	Kapillar dolum süresi
L	Total lizis süresi
LA	Sol atriyum
LAE	Sol atriyal büyüme
LC-MS	Likit kromatografi-mass spektrometresi
LDH	Laktat dehidrojenaz
LL	Latero-lateral
LPA	Sol pulmoner arter
LV	Sol ventrikül
LVDD	Sol ventrikül diyastol
LVDS	Sol ventrikül sistol
LVFW	Sol ventrikül serbest duvar
LVOT	Sol ventrikül çıkış yolu
LVPWD	Sol ventrikül serbest duvar diyastol
LVPWS	Sol ventrikül serbest duvar sistol
Ly30	30 dk daki lizis
MA	Maksimum amplitüd
MAP	Ortalama arteriyel basınç
MCH	Ortalama hücre hemoglobin
MCHC	Ortalama hemoglobin konsantrasyonu
MCV	Ortalama hücre volümü
MMP	Matriks metalloproteinaz
MMVD	Miksamatöz mitral kapak hastalığı
MPA	Ana pulmoner arter
MPV	Ana pulmoner ven
MRL	Maksimum lizis oranı
MRTG	Trombus oluşumunun maksimum oranı
MS	Kütle spektrometri
MV	Mitral kapak
MVP	Mitral kapak prolapsusu
Na	Sodyum
ng/ml	Nanogram / mililitre
NO	Nitrik oksit
NT-PROBNP	N terminal pro B tipi natriüretik peptit
P	Pulzasyon
PAF	Platelet aktive edici faktör
PCT	Plateletcrit
PDW	Platelet dağılım genişliği

PEP	Pre-ejeksiyon periyodu
PG	Progesteron
PLT	Platelet
PO	Per os
PPP	Plateletten fakir plazma
PRP	Plateletten zengin plazma
PT	Protombin zamanı
PV	Pulmoner ven
PW	Pulse wave
R	Respirasyon
R süresi	Reaksiyon süresi
RA	Sağ atriyum
RAAS	Renin anjiyotensin aldosteron sistemi
RAE	Sağ atriyal büyüme
RBC	Kırmızı kan hücreleri
RDW	Retikülosit
RPA	Sağ pulmoner arter
RVDD	Sağ ventrikül diyastol
SAP	Sistolik arteriyel basınç
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
Sn	Saniye
SSS	Santral sinir sistemi
T	Beden sıcaklığı
T4	Tiroksin 4
TAT	Trombin antitrombin antikorları
TB	Total bilirubin
TEG	Tromboelastografi
TF	Doku faktör
TG	Total trombus oluşumu
TMRL	MRL için geçen süre
TMRTG	MRTG için geçen süre
TNF	Tümör nekrozis faktör
TP	Total protein
TT	Trombin zamanı
TV	Triküspit kapak
UPLC	Ultra performanslı likit kromatografi
UPLC-ESI/QTOF/MS	Yüksek performanslı sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon/dört kutuplu uçuş süresi, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
VD	Ventrodorsal
VHS	Vertebral kalp skalası
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
VMAX	Maksimum volüm
VWF	von Willebrand faktör

## 8. EKLER

### TABLO LİSTESİ

<b>Tablo No</b>	<b>Başlık</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo-1</b>	Sistolik kalp yetmezliğinde klinik bulgu ve patofizyolojik mekanizmaları	8
<b>Tablo-2</b>	Diyastolik kalp yetmezliğinde klinik bulgu ve patolojik mekanizmaları	8
<b>Tablo-3</b>	ACVIM klasifikasyonuna göre kalp yetmezliğinin grup ve alt gruplarına ayrılması, tedavi seçeneklerinin sunulması	9
<b>Tablo-4</b>	Hemostazis değerlendirilmesinde kullanılan laboratuvar testleri ve Hedefleri	16
<b>Tablo-5</b>	Tromboelastografi (TEG)'de ölçülen parametrelerin anlamı, birim ve kabul görmüş kısa ifadeleri	18
<b>Tablo-6</b>	Tromboelastografi (TEG)'de ölçülen parametrelerin pıhtı oluşumu, stabilitesi ve lizisi ile ilgisi	18
<b>Tablo-7</b>	Çalışmalardan elde edilen bazı platelet proteomları	23
<b>Tablo-8</b>	Felçli İnsanlarda platelet proteomlarındaki değişimler, kontrole göre artışları, sınıf ve lokalizasyonları	24
<b>Tablo-9</b>	Dilate kardiyomyopati (DCM) tanı kriterleri	28
<b>Tablo-10</b>	Miksamatos mitral kapak hastalığı (MMVD) tanı kriterleri	28
<b>Tablo-11</b>	Radyolojik bulguların varlığı ve şiddetine göre skorlandırılarak konjestif kalp yetmezliğinin belirlenmesi	29
<b>Tablo-12</b>	Bu çalışmada tanımlanan toplam ve anlamlı protein sayıları	47
<b>Tablo-13</b>	Kontrol ve test grubu olguların signalement ve bazı klinik bulguları	48
<b>Tablo-14</b>	Kontrol ve test grubu olguların signalement ve bazı klinik bulgularının median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamaları	48
<b>Tablo-15</b>	Kontrol ve test grubu olguların sistolik (SAP), diyastolik (DAP) ve ortalama kan basınçları (MAP)	50
<b>Tablo-16</b>	Kontrol ve test grubu olguların sistolik (SAP), diyastolik (DAP) ve ortalama kan basınçları (MAP); median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamaları (mmHg)	50
<b>Tablo-17</b>	Kontrol ve test grubu olguların vertebral kalp skorları (VHS)	50
<b>Tablo-18</b>	Kontrol ve test grubu olguların vertebral kalp skorları (VHS); median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamaları	50
<b>Tablo-19</b>	Kontrol ve test grubu olguların sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyden alınan M-mode ölçümleri	53

<b>Tablo-20</b>	Kontrol ve test grubu olguların sağ parasternal kısa eksen papillar kas düzeyden alınan M-mode ölçümleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamaları	54
<b>Tablo-21</b>	Kontrol ve test grubu olguların sağ parasternal kısa eksen aort düzey çapsal ölçümleri.	55
<b>Tablo-22</b>	Kontrol ve test grubunda sağ parasternal kısa eksen Ao düzey çaplar; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	55
<b>Tablo-23</b>	Kontrol ve test grubu olguların pulmoner arter, aort, mitral kapak ve trikuspid kapak Doppler ölçümleri	56
<b>Tablo-24</b>	Kontrol ve test grubu olguların pulmoner arter, aort, mitral kapak ve trikuspid kapak Doppler ölçümleri - median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	56
<b>Tablo-25</b>	Kontrol ve test grubu olguların lökogram değerleri	60
<b>Tablo-26</b>	Kontrol ve test gruplarında lökogram değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	60
<b>Tablo-27</b>	Kontrol ve test grubu olguların eritrogram değerleri	61
<b>Tablo-28</b>	Kontrol ve test gruplarında eritrogram değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	61
<b>Tablo-29</b>	Kontrol ve test grubu olguların trombogram değerleri	62
<b>Tablo-30</b>	Kontrol ve test gruplarında trombogram değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	62
<b>Tablo-31</b>	Kontrol ve test grubu olguların serum kardiyak troponin (cTnI) değerleri	63
<b>Tablo-32</b>	Kontrol ve test gruplarında serum kardiyak troponin I (cTnI) değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	63
<b>Tablo-33</b>	Kontrol ve test grubu olguların serum biyokimyasal değerleri	64
<b>Tablo-34</b>	Kontrol ve test gruplarında serum biyokimyasal değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	65
<b>Tablo-35</b>	Kontrol ve test grubu olguların serum T4 ve kolesterol değerleri	66
<b>Tablo-36</b>	Kontrol ve test gruplarında serum tiroksin ve kolesterol değerleri; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	66
<b>Tablo-37</b>	Kontrol ve test grubu olguların PT ve aPTT değerleri	66
<b>Tablo-38</b>	Kontrol ve test grubu olgularda PT ve aPTT; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	66
<b>Tablo-39</b>	Kontrol ve test grubu olguların tromboelastografi (TEG) sonuçları	67
<b>Tablo-40</b>	Kontrol ve test grubu olguların tromboelastografi (TEG) sonuçları; median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	68
<b>Tablo-41</b>	Kontrol ve test grubu olguların tromboelastografik (TEG) velosite curve verileri (TEG V-curve)	70
<b>Tablo-42</b>	Kontrol ve test grubu olguların thromboelastografik (TEG) velosite curve verileri (TEG V-curve); median, minimum, maksimum ve %25-75'lik dilimdeki ortalamalar	70



<b>Tablo-43</b>	Platelet sayısı ve indekslerinin (PCT, MPV ve PDW) TEG ve V-curve verileri ile korelasyonları.	72
<b>Tablo-44</b>	Sağlıklı kontrol ve test grubunun platelet izolatlarında ortak olarak bulunan tüm proteinler (toplam 107 adet).	73
<b>Tablo-45</b>	Kontrol ve hasta (test) gruplarında istatistiksel düzeyde farklılık gösteren platelet proteomlarının accession numaraları, peptid sayıları ve skorları	79

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil No</b>	<b>Başlık</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil-1</b>	Platelet aktivasyonu ve sonrasında alfa ve dense granüllerden salınan mediatörlerle koagülasyon zincirinin aktive olması	14
<b>Şekil-2</b>	Sekonder hemostazisde intrinsik, ekstrinsik ve yaygın yol üzerinden stabilize fibrin (pıhtı) oluşumu	15
<b>Şekil-3</b>	Tromboelastografi (TEG) - normal ve patolojik değişimlerine örnekler ve TEG parametrelerinin pıhtılaşma sistemine karşılık gelen bölümleri	17
<b>Şekil-4</b>	TEG’de velocity curve verilerinin şematize edilmesi	18
<b>Şekil-5</b>	Platelet izolasyon algoritması - kan alma, santrifüj ve buffy coat ayrımı	34
<b>Şekil-6</b>	Platelet izolasyon algoritması - HEPES tampon çözeltisi ve Amonyum Bikarbonat yıkama, platelet pelletinin son hali	35
<b>Şekil-7</b>	Plateletten fakir (PPP) ve zengin plazmaların (PRP) tromboelastografik (TEG) olarak sayı ve fonksiyonlarının değerlendirilmesi	35
<b>Şekil-8</b>	DCM’ye bağlı konjestif kalp yetmezliği gelişen bir köpekte klinik yansımalar	49
<b>Şekil-9</b>	DCM’ye ve MMVD’e bağlı konjestif kalp yetmezliği gelişen olgulardaki radyolojik değişiklikler	51
<b>Şekil-10</b>	Konjestif kalp yetmezliği olan köpeklerden EKG örnekleri	52
<b>Şekil-11</b>	Kalp yetmezliği tanımlanan olgularda ekokardiyografik görüntüler (2D, M-mode ve renkli Doppler)	57
<b>Şekil-12</b>	Kalp yetmezliğinde renkli Doppler ve M-mode muayene	58
<b>Şekil-13</b>	Kalp yetmezliği olan hastalardan pulmonar arter, aort ve mitral kapak akım karakteristiklerinin ölçülmesi	59
<b>Şekil-14</b>	Kontrol ve test gruplarına ait serum kardiyak troponin (cTnI) düzeyleri	63
<b>Şekil-15</b>	DCM’li ve CVHD’li olgularda tromboelastografik (TEG) değerlendirme	69
<b>Şekil-16</b>	DCM’li ve CVHD’li olgularda TEG Velosite Curve profilleri.	71
<b>Şekil-17</b>	Bu çalışmada izole edilen platelet proteomlarının <i>Canis lupus familiaris</i> (evcil köpek) protein veri tabanına göre tanımlanması	76
<b>Şekil-18</b>	Platelet proteomlarının moleküler - biyolojik fonksiyonları ve birbirleri ile bağlantıları (reoctome analizi)	76

<b>Şekil-19</b>	Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının moleküler fonksiyonları ve dağılımları	77
<b>Şekil-20</b>	Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının biyolojik fonksiyonları ve dağılımları	77
<b>Şekil-21</b>	Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının sellüler yapılarıdaki dağılımları	78
<b>Şekil-22</b>	Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının yolak (pathway) analizi	78
<b>Şekil-23</b>	Kontrol ve test grubunda anlamlı değişim gösteren platelet proteomlarının protein sınıfları	79
<b>Şekil-24</b>	Kontrol grubuna göre test grubunda artan ve azalan proteinler.	80
<b>Şekil-25</b>	Kontrol ve test grubunda platelet apolipoprotein C-III düzey değişimi	80
<b>Şekil-26</b>	Kontrol ve test grubunda platelet apolipoprotein A-II düzey değişimi	81
<b>Şekil-27</b>	Kontrol ve test grubunda platelet guanine nucleotid-binding protein düzey değişimi	81
<b>Şekil-28</b>	Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet clusterin düzeyindeki değişim	82
<b>Şekil-29</b>	Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet cathepsin D düzeyindeki değişim	82
<b>Şekil-30</b>	Kontrol ve test grubunda platelet cytochrome oxidase düzey değişimi	83
<b>Şekil-31</b>	Kontrol ve test grubunda platelet C-X-C chemokine 10 düzey değişimi	83
<b>Şekil-32</b>	Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet serine/threonine-protein phosphatase düzeyindeki değişim	84
<b>Şekil-33</b>	Kontrol ve test (hasta) grubunda platelet myotrophin düzeyindeki değişim	84
<b>Şekil-34</b>	Kontrol ve test grubunda platelet creatine kinase B-type düzeyi değişimi	85
<b>Şekil-35</b>	Bu çalışmada plateletlerden elde edilen istatistiksel 10 adet anlamlı protein ve fraksiyonlarının birbiri ile etkileşimi	85
<b>Şekil-36</b>	Bu çalışmada platelet izolatlarından elde edilen ve <i>Canis lupus familiaris</i> protein data bankına göre tanımlanan tüm proteinler; bu proteinlerin birbiri ile olan ilişkisi	86

## 9. TEŞEKKÜR

Doktora programına başladığım günden bugüne en başta hayata ve kişisel gelişimime, daha sonra akademik hayata ve duruşa dair tüm birikimlerini benimle zaman ve mekan ayırt etmeksizin paylaşmaktan çekinmeyen, öğrencisi olmaktan her daim gurur duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Zeki YILMAZ'a, tez çalışmasının yapılabilmesi için maddi destek sağlayan (DDP(v)2017/6) Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, tezin laboratuvar analizleri için bilgi ve hizmet alımı sağladığımız Doç. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL ve asistanı Emel AKGÜN'e (Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, İstanbul), trombosit izolasyonu aşamasında bilgi, deneyim ve birikimlerini bizimle paylaşmaktan çekinmeyen Doç. Dr. Özge ÇEVİK'e (Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, Aydın), mesleki kazanımlarımda katkıları olan İç Hastalıkları Anabilim Dalı hocaları ve arkadaşlarıma, tez vakaların toplanması, çalışılması ve verilerinin işlenmesinde büyük katkı sağlayan arkadaşım ve meslektaşım Dok. Öğr. Ahmet SARIL'a, tez çalışmalarım esnasında manevi desteğini esirgemeyen Hasan Arda KARABARUT'a, özellikle doktora sürecimde bana yoldaş olan can arkadaşım Gönen ALKAÇ'a, hayatımda özel yeri olan tüm arkadaşlarıma ve bugüne gelebilmemde bana en büyük desteği sağlayan, hayatımın her alanında, her daim yanımda olan aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Antalya’da doğmuştur. İlkokulu Bodrum Cumhuriyet İlköğretim Okulu’nda, ortaokulu Bodrum Bitez Gülümser Mehmet Danacı İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimi 2008 yılında Bodrum Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. 2008 yılında yerleştiği Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2013 yılında mezun olmuş, 2013 güz yarıyılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne kaydını yaparak Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda doktora programına başlamıştır.

Prof. Dr. Zeki YILMAZ’ın yürütücülüğünde TOVAG-2130032 numaralı “Köpeklerde Vektör Aracılı Enfeksiyonların (Anaplasmosis, Dirofilariasis, Ehrlichiosis, Leishmaniasis ve Lyme) Tanısında Yeni Biyobelirteçlerin İdentifikasyonu ve Validasyonu” isimli COST projesinde (European Cooperation in Science and Technology, TD1303) 36 ay süreyle bursiyer olarak görev almıştır. Doktora eğitimi sürecinde ulusal ve uluslararası kongrelere katılımcı olmuş, bazılarında poster ve sözlü sunumlar yapmıştır. Küçük hayvan kardiyolojisi öncelikli ilgi alanıdır.