

163536



OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KONJENİTAL KALP HASTALIKLI ÇOCUKLARDA
ANJİYOGENEZİN BİYOKİMYASAL GÖSTERGESİ OLAN
VEGF VE MMP-9 DÜZEYLERİ İLE BNP İLİŞKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. AYŞE ÖZKIRIŞ

DANIŞMAN
Prof.Dr. ÖMER ÇOLAK

Haziran 2005
ESKİŞEHİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER _____	1
ÖZET _____	2
ŞEKİLLER DİZİNİ _____	5
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ _____	5
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ _____	6
I. GİRİŞ VE AMAÇ _____	8
II. GENEL BİLGİLER _____	10
II.1. ANJİYOGENEZ _____	10
II.2. VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) _____	12
II.3. MMP(Matrix Metalloproteinase) _____	18
II.4. BNP(Brain Natriuretic Peptide) _____	24
II.5. KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI _____	29
III. MATERYAL VE METODLAR _____	31
IV. BULGULAR _____	37
V. TARTIŞMA _____	43
VI. SONUÇ _____	53
VII. KAYNAKLAR _____	55

ÖZET

Konjenital kalp hastalıkları, gelişmiş tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen doğum sonrası ilk bir yıl içerisindeki ölüm nedenleri arasında önemli yer tutan bir hastalık grubudur. Özellikle konjenital kalp hastalıklarında gözlenen kronik hipoksi tablosu, bu hastalarda anormal kollateral damarların gelişimine yolaçan anjiyogenez için tetikleyici bir faktör olabilir.

Anjiyogenez, hipoksi ve iskemi durumlarında daha iyi kanlanma ve beslenme sağlanması nedeniyle istenen bir durum iken; oluşan kollateral damarların persistan özellikte bir soldan sağa şant oluşturması nedeniyle cerrahi tedavi başarısını azaltan bir morbidite faktörüdür. Çünkü anormal kollateral oluşumu kalbin hemodinamik yükünü artırmaktadır.

Anjiyogenezle ilgili biyokimyasal parametrelerin konjenital kalp hastalığı ve siyanozla ilişkilerinin bilinmesi, bu hastalık grubunda anjiyogeneze bağlı olarak oluşan faydalı ve zararlı etkilerin yönlendirilmesi yoluyla yeni terapötik yaklaşımların önünü açabilir. Ayrıca kalp yetmezliğinin biyokimyasal belirteci olarak rutin laboratuvar uygulamalarında son zamanlarda yerini alan BNP'nin anjiyogenik faktörlerle ve konjenital kalp hastalığındaki siyanozla ilişkisinin tespit edilmesi, bu parametrenin de tanı ve tedavi takibinde kullanımı ile ilgili bilgiler sağlayabilir.

Bu çalışmada, siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalıklı çocuklarda anjiyogenezle ilgili faktörlerden VEGF ve MMP-9 ile BNP düzeylerini araştırmayı ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırmayı amaçladık.

11 siyanotik, 35 asiyanotik konjenital kalp hastası ve 29 sağlıklı çocukta yaptığımız çalışmada, plazma VEGF, MMP-9 ve BNP düzeyleri saptandı. Gruplar arasındaki farklılıklar ve siyanotik grupta kronik hipoksiyle bu parametrelerde meydana gelen değişim değerlendirildi.

Plazma VEGF düzeyleri siyanotik hasta grubunda, asiyanotik gruba ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı Şekilde yüksek bulundu.(sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). Asiyanotik grupta plazma VEGF değerleri sağlıklı kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen, istatistiksel düzeyde anlamlılık saptanmadı.($p>0.05$).

Asiyanotik ve siyanotik hasta gruplarında plazma MMP-9 düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.(sırasıyla $p>0.05$, $p>0.05$). Plazma MMP-9 düzeyleri siyanotik ve asiyanotik hasta grupları arasında da anlamlı farklılık göstermedi. ($p>0.05$).

Plazma BNP düzeyleri, siyanotik hasta grubunda, asiyanotik ve sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı Şekilde yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). Asiyanotik grup plazma BNP düzeyleri, sağlıklı kontrol grubunda yüksek olarak tespit edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. ($p>0.05$)

Plazma VEGF, MMP-9 ve BNP düzeyleri arasında her hasta grubunda ayrı ayrı korelasyon değerlendirmesi yapıldığında siyanotik grupta VEGF ve MMP-9 düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi. ($r=0.67$, $p<0.05$)

Ayrıca siyanotik grup plazma VEGF düzeyleri ile arteriyel kan oksijen saturasyonları arasında anlamlı negatif korelasyon tespit edildi. ($r=-0.69$, $p<0.05$)

Bu bulgular, konjenital kalp hastalıklı çocuklarda anjiyogenez gelişimini gösterilmesi iÇin VEGF lŐmnn iyi bir gösterge olduğunu, ayrıca plazma VEGF düzeylerinin hipoksinin derecesiyle orantılı olarak arttığını göstermektedir.

Anjiyogenez gelişimi için MMP gerekliliği daha önce yapılan çalışmalarda kesin olarak gösterilmiş olmasına rağmen, MMP-9 düzeylerinde anlamlı olmayan bir yükselme tespit edilmiştir. Bu durum, MMP salınım ve aktivitesinin hipoksi dışında birçok faktörden etkilenmesiyle ilişkili olabilir.

BNP düzeylerinde meydana gelen anlamlı yükselme, kronik hipoksinin BNP üzerine uyarıcı bir etkisi olabileceği hipotezini doğrulamaktadır.

VEGF, MMP-9 ve BNP düzeylerinin konjenital kalp hastalığında ve kronik hipoksi durumundaki değişimlerini doğrulamak için, bu parametreler üzerine etkili diğer faktörlerin elimine edildiği daha geniş hasta serilerinde çalışılması yararlı olacaktır.



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil II.1. Hipoksi etkisiyle anjiyogenez oluşumu _____	11
Şekil II.2. VEGF reseptörleri _____	13
Şekil II.3. MMP'lerin yapısal özellikleri _____	19
Şekil II.4. BNP'nin fizyolojik yapısı _____	25

TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo IV.1. Sağlıklı kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma VEGF değerleri	37
Tablo IV.2. Sağlıklı kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma MMP değerleri	39
Tablo IV.3. Sağlıklı kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma BNP değerleri	41
Grafik III.1. VEGF ölçümü kalibrasyon grafiği _____	33
Grafik III.2. MMM-9 ölçümü kalibrasyon grafiği _____	35
Grafik IV.1. Sağlıklı kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma VEGF düzeyleri	38
Grafik IV.2. Sağlıklı kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma MMP düzeyleri	40
Grafik IV.3. Sağlıklı kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma BNP düzeyleri	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANP	Atriyal Natriüretik Peptid
ASD	Atriyal Septal Defekt
BAT	Büyük Arterlerin Transpozisyonu
BNP	Brain Natriüretik Peptid
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
CV	Değişim Katsayısı
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzim İşaretli İmmünölçüm
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
HIF	Hipoksi İnducible Transkripsiyon Faktörü
ICAM	İntersellüler Adezyon Molekülü
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGF-BP	İnsülin Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
IL	İnterlökin
KGF	Keratinosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
LAD	Sol Ön İnen Koroner Arter
ml	Mililitre
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MT-MMP	Membran Tipi Matriks Metalloproteinaz
NEP	Nötral Endopeptidazlar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NO	Nitrik Oksit
NPR	Natriüretik Peptid Reseptörü
NT-proBNP	N-Terminal proBrain Natriüretic Peptid
PDA	Patent Ductus Arteriosus

PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
pg	Pikogram
SEM	Standart Hata
TA	Trunkus Arteriozus
TAPVR	Total Anormal Venöz Dönüş Anomalisi
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
TIMP	Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör-alfa
TOF	Fallot Tetralojisi
t-PA	Doku Tipi Plazminojen Aktivatörü
u-PA	Ürokinaz Tipi Plazminojen Aktivatörü
VCAM	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VPF	Vasküler Permeabilite Faktörü
VSD	Ventriküler Septal Defekt
Zn ⁺²	Çinko
μ	Mikron

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Konjenital kalp hastalıkları; gelişmiş tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen, halen doğum sonrası ilk bir yıl içerisindeki ölüm nedenleri arasında önemli yer tutan bir hastalık grubudur. Özellikle, siyanotik konjenital kalp hastalıklı çocuklarda anormal damarların gelişimi önemli bir morbidite kaynağıdır (1). Ayrıca, anormal kollateral oluşumu, persistan özellikte bir soldan-sağa şantın gelişimine sebep olduğundan dolayı kalbin hemodinamik yükünü artırarak cerrahi tedavi başarısını azaltır (2).

Kardiyovasküler sistemin çeşitli patolojilerinde anjiyogenez gelişiminin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi amacıyla, plazma VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) ve MMP(Matrix Metalloproteinases) düzeylerinin ölçümüne dayalı araştırma çalışmaları son yıllarda giderek artmasına rağmen, konjenital kalp hastalıklı çocuklarda bu parametrelerin değerlendirilmesi ile ilgili veriler son derece sınırlıdır.

Konjenital kalp hastalıklarında anjiyogenez varlığının değerlendirilmesi, uygun tedavi yönteminin seçimi, tedavi etkinliğinin takip edilmesi ve belki de gelecekte anti-anjiyogenik ilaç tedavilerinin geliştirilmesiyle tedaviye yeni boyut kazandırılmasına hizmet edecektir.

Plazma BNP(Brain Natriuretic Peptide) düzeylerinin ölçümü, konjestif kalp yetmezlikli erişkin hastaların tanı, tedavi ve takibinde son derece yararlı bir biyokimyasal belirteç olarak yerini almış olmasına rağmen, konjenital kalp hastalıklarına bağlı olarak düzeylerinin nasıl değiştiği hakkındaki bilgilerin yetersiz olması bu parametrenin klinik kullanımını sınırlandırmaktadır (3).

Konjenital kalp hastalıklı çocuklarda plazma BNP düzeylerinin tespit edilmesi, bu hastalıklarda meydana gelen fizyopatolojik değişikliklere organizmanın verdiği cevapların değerlendirilmesini sağlarken, BNP'nin kalp yetmezliği dışındaki kardiyovasküler patolojilerde kullanımı ile ilgili veriler sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında, sağlıklı ve konjenital kalp hastalıklı çocuklarda VEGF, MMP-9 ve BNP düzeylerini saptamayı, ayrıca siyanotik konjenital kalp hastalıklarında kronik hipoksinin etkisiyle bu parametrelerde meydana gelebilecek değişiklikleri değerlendirmeyi ve bu parametreler arasında bir korelasyon bulunup bulunmadığını tespit etmeyi amaçladık.



II. GENEL BİLGİLER

II.1. ANJİYOGENEZ

Embriyonik ve postembriyonik dönemde dolaşım sisteminin gelişmesi ve sürekliliği için yeni damar oluşumu gereklidir. Embriyonik dönemde görülen ve kök hücrelerinin farklılaşmasından meydana gelen yeni kan damarı oluşumu 'vaskülogenez' olarak adlandırılır (4). *Anjiyogenez* ise; varolan vaskülarite üzerinden yeni kan damarlarının büyüme ve gelişmesidir (5).

Anjiyogenez terimi ilk kez 1935'te Hertig tarafından plasentadaki kan damarı gelişimini tanımlamak için kullanılmıştır. Normal gelişim süreci, yara iyileşmesi, menstrüel siklusu oluşturan endometrial değişiklikler gibi çeşitli fizyolojik olayların gelişimiyle ilişkili olan anjiyogenez; başta neoplastik hastalıklar olmak üzere kollajen doku hastalıkları, retinopatiler, psöriazis, iskemik kalp hastalığı gibi çeşitli patolojik durumlarda da kritik öneme sahiptir (6,7).

Kesin mekanizmalar tümüyle anlaşılamamış olsa da; patolojik anjiyogenez basamakları kısaca şöyledir:

- Patolojik duruma maruz kalan dokudan anjiyogenik büyüme faktörlerinin üretimi ve salınımı. Anjiyogenik büyüme faktörleri içinde en önemlisi ve en çok üzerinde durulanı VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)'dir (8).
- Anjiyogenik büyüme faktörlerinin, varolan kan damarları endotel hücreleri üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanması
- Aktive olmuş endotelyal hücrelerden ekstrasellüler proteolizisi sağlayacak enzimlerin üretimi ve salınımı. Ekstrasellüler proteolizise pek çok enzim sistemi katılıyor olsa da; çoğu 2 enzim ailesinden birisine aittir:

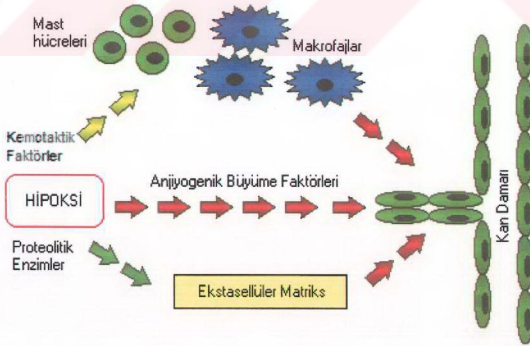
1. Serin proteazlar

2. MMP'ler (Matriks Metalloproteinases)

- Bazal membranın ve ekstrasellüler matriksin yıkımı

- Aktive olmuş endotel hücrelerinin, fibroblastlar, monositler, trombositler, mast hücreleri ve nötrofillerin salgıladığı kemotaktik faktörlerin etkisi altında anjiyogenezin gerekli olduğu sahaya göç etmesi
- Endotel hücrelerinin proliferasyonu ve vasküler lümen oluşturmak üzere diferansiasyonu
- Yeni oluşan vasküler yapının düz kas hücreleri ve perisitlerle desteklenmesi ve stabilize edilmesi (7).

Anjiyogenez, hipoksi veya iskemiye cevap olarak hızla başlar. Myokard dokusundaki anjiyogenez sonrası kolleteral kan damarı oluşumunun tahmini mekanizması şöyledir: Koroner blokaj alanındaki endotelial hücreler daha az kan akımı ve daha az O₂'e maruz kaldıklarında oluşan hipoksi, bu hücrelerde HIF-1a (Hypoxia-Inducible Factor 1-a)'nın birikmesine yol açar. HIF-1a, VEGF ekspresyonunu uyarır. Bu da epitel hücrelerdeki VEGF reseptörleriyle etkileşime girerek bölünmelerini uyarır ve kollateral kan damarı oluşumuna yol açar (7) (Şekil II.1).



Şekil II.1. Hipoksi etkisiyle anjiyogenez oluşumu

II.2. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Genel Özellikleri:

VEGF; arterler, venler ve lenfatiklerden köken olan mikrovasküler ve makrovasküler endotelial hücreler için potent bir mitojendir. Fakat diğer hücre tipleri için sürekli ve yoğun bir mitojenik aktivitesi yoktur. VEGF adlandırması, bu sınırlı hedef hücre spesifitesinin vurgulanması amacıyla önerilmiştir (9).

VPF(Vascular Permeability Factor) veya vaskülotropin olarak da bilinen VEGF, 45 kDa'luk homodimerik bir glikoproteindir. VEGF, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır (8).

VEGF'nin A,B,C,D,E ya da aminoasit sayılarına göre VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ ve VEGF₁₄₅ gibi isoformları bulunmaktadır. Bu isoformlar, moleküler kütle ve hücre yüzeyi heparan sülfat proteoglikanlarına tutunma gibi biyolojik özellikleri açısından farklıdır (8,10).

VEGF₁₂₁ , heparine bağlanmayan serbest solubl proteindir. VEGF₁₆₅, predominant isoformudur, kısmen hücre yüzeyi ve ekstrasellüler matrikse bağlı kalan heparin bağlayıcı temel solubl homodimerdir.

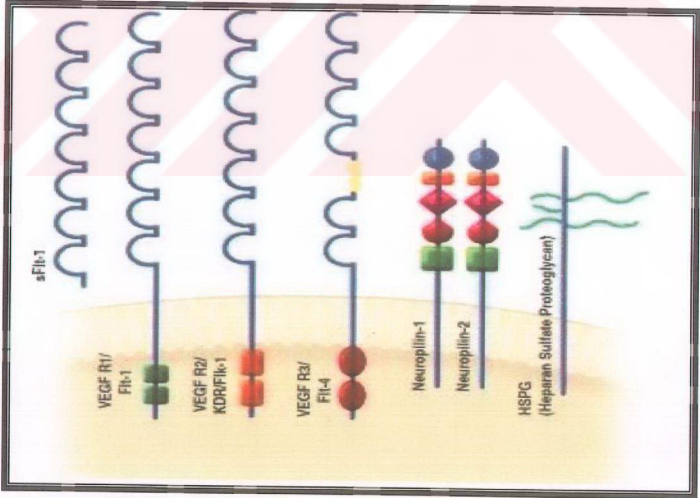
Ekstrasellüler matriksin heparin içeren proteoglikanlarına büyük oranda bağlı bulunmaları ve sınırlı salınımları nedeniyle VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ isoformları dolaşımında çok az miktarda bulunurlar. Anjiyogenez oluşturmada en etkili isoformları, VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅'dir (11).

Patolojik durumlarda tüm dokular VEGF üretebilir. Normal dokularda ise aktive makrofajlar, keratinositler, renal glomerüler ve mezengial hücreler, embriyonik fibroblastlar gibi birçok hücrede VEGF ekspresyonu gösterilmiştir(8).

VEGF, biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirir:

1. VEGFR-1 → Flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1)
2. VEGFR-2 → KDR/Flk-1 (kinase domain region/fetal liver kinase-1)
3. VEGFR-3 → Flt-4 (fms-like tyrosine kinase-4)

Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörlerden VEGFR-1 ve VEGFR-2 endotel hücreleri üzerinde bulunurken, VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca VEGFR-1, trofoblast hücreleri, monositler ve renal mezengial hücrelerden; VEGFR-2, hematopoetik kök hücreler, megakaryositler ve retinal progenitör hücrelerden de eksprese edilebilmektedir (9,10,12). (Şekil II.2)



Şekil II.2. VEGF reseptörleri

VEGF reseptörlerinin hipoksiye yanıt olarak üretimi -VEGF üretiminden daha az olmak üzere- artar. VEGF'nin antiapoptotik ve mitotik fonksiyonları VEGFR-2 aracılığıyla gerçekleştirilir. VEGFR-1'in uyarılmasının bu yanıtları oluşturmamasının sebebi tam olarak açıklanamamıştır (10).

Endotel hücreleri, VEGFR'lerinden daha küçük kütleye sahip "*neuropilin-1*" adında bir reseptör daha içerirler. Bir çalışmada, neuropilin-1 eksprese eden hücrelerde, VEGF₁₆₅'in VEGFR-2'e daha etkin olarak bağlandığı gösterilmiştir (15). Neuropilin-1, VEGF₁₆₅'in VEGFR-2'e bağlanması için bir ko-reseptör görevi görür. Bu durum, VEGF₁₆₅'in VEGF₁₂₁'den daha potent mitojen ve migratuar etki göstermesinin sebebi olabilir (10,14).

VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz C, fosfoinositol-3 kinaz ve rasGTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile eder. Bu aktivasyon, anjiogenezin ilk basamağında kan damarları basal membranın yıkılması için gerekli olan proteazların üretimi, anjiogenez için gerekli spesifik integrinlerin ekspresyonu ve sonunda hücre proliferasyon, migrasyon ve diferansiasyonu ile sonuçlanır (10,13).

VEGF Sentezinin Regülasyonu:

VEGF gen ekspresyon regülasyonunda birçok mekanizmanın etkili olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında gerek in vivo, gerek in vitro olarak oksijen basıncı çok büyük bir rol oynar (9).

Normal ve transforme edilmiş hücre kültürlerinde, düşük oksijen basıncına maruz kalmakla VEGF mRNA ekspresyonunun hızlı bir şekilde ve reversibl olarak indüklendiği gösterilmiştir (9,17).

Başta hipoksi etkisiyle olmak üzere, düşük glukoz seviyesi ve oksidatif stres durumlarında ortamda düzeyi hızla artan HIF-1a VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (19).

Domuz myokardiumunda, LAD(Left Anterior Descenden) koroner arterin oklüzyonuna bağlı olarak oluşan iskeminin, VEGF RNA seviyelerinde dramatik bir artışla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu durum, myokardial iskemiye takiben spontan revaskülarizasyona, VEGF'nin aracılık edebileceğini öngörür (9).

VEGF üretimi, anjiyogenez üzerine indirekt olarak etki gösteren başka faktörler tarafından da düzenlenir. Diğer büyüme faktörleri, sitokinler ve gonadotropinler anjiyogenezi direkt olarak değil, VEGF ekspresyonu üzerine yaptıkları etkilerle indirekt olarak etkiler. Bu yolla VEGF üretimini artırabilen faktörler: FGF-4(Fibroblast Growth Factor-4), PDGF(Platelet Derived Growth Factor), TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), KGF(Keratinocyte Growth Factor), IGF-I(Insulin-like Growth Factor-I), IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6(Interleukin-6)'dır. IL-10(Interleukin-10) ve IL-13(Interleukin-13) gibi bazı sitokinler VEGF salınımını inhibe edebilir (10).

VEGF üretiminin düzenlenmesi üzerine hormonal etkilerin de olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Östrojenler,progesterinler ve testosteronun VEGF-A ekspresyonunu hücre kültür çalışmalarında artırdığı ile ilgili veriler yayınlanmıştır (20).

VEGF'nin Biyolojik Etkileri:

VEGF, sistemik ve pulmoner dolaşımdaki vasküler büyümeyi düzenleyen, potent bir endotelial hücre mitojeni ve proanjiyogenik bir ajandır (16).

VEGF'nin in vitro modellerde üç boyutlu olarak anjiyogenezi başlattığı gibi; civciv koryoallantoik membranı, tavşan korneası, primat irisi ve tavşan

kemiği gibi in vivo modellerde de güçlü anjiyogenik cevaba neden olduğu gösterilmiştir (9).

VEGF, temel anjiyogenik faktör olma özelliği yanında; VEGF'e maruz kalan damarlarda endotel hücreleri arasında fenestrasyon, vesiküler organeller ve transselüler gap oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırır. *Dvorak ve arkadaşları*, tümörler ve yara iyileşmesi ile ilgili anjiyogeneizde, VEGF'nin mikrovasküler permeabiliteyi artırması yoluyla, plazma protein sızıntısını başlattığını ileri sürmüşlerdir. Bu etki, endotel ve tümör hücre büyümesi için bir substrat olan ekstravasküler fibrin jel oluşumu ile sonuçlanacaktır (9,21).

VEGF'nin vasküler endotel üzerine bir başka etkisi; heksos transportunun uyarılmasıdır. Sığır aortik endotel hücrelerinin VEGF'e maruz bırakılması, heksos transportunda anlamlı bir artışla sonuçlanmıştır. Bu etki, endotel hücre proliferasyonu veya inflamasyon sürecinde artmış enerji ihtiyacının karşılanması ile ilgili olabilir (9).

Son zamanlarda VEGF'nin endotel hücrelerdeki VCAM-1(Vascular Cell Adhesion Molecule) ve ICAM-1(Intracellular Adhesion Molecule) ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. Bu uyarı, aktive olmuş Natural Killer hücrelerin endotel hücreleri üzerine adezyonuyla sonuçlanabilir (9).

VEGF'nin bazı kan hücreleri üzerine de düzenleyici etkileri vardır. VEGF'nin monosit kemotaksisini uyarabileceği, dendritik hücreler gibi profesyonel antijen sunucu hücrelerin matürasyonu üzerine inhibitör bir etkisi olabileceği ile ilgili çalışmalar yayınlanmıştır. Özellikle dendritik hücre matürasyonunu engelleyici etki; VEGF'nin immun cevap uyarısını baskılayarak tümör büyümesini uyarması anlamına gelen "*provakatif hipotez*"in gelişmesine yol açmıştır (9).

VEGF, bilinci açık deney ratlarına intravenöz yolla uygulandığında kardiyak out-putta bir azalma ile geçici bir taşikardi ve hipotansiyon oluşturur. İn vitro hayvan modellerinde ise, doza bağımlı bir tarzda vazodilatasyonu indükler. Bu etkiler, primer olarak endotelial hücre kaynaklı nitrik oksit(NO) aracılığıyla gerçekleşiyor gibi görünmektedir. Ancak bu hemodinamik etkiler, yalnızca VEGF'e mahsus değildir. FGF(Fibroblast Growth Factor) gibi diğer anjiyogenik faktörler de, NO ilişkili vazodilatasyon ve hipotansiyonu uyarıyor olabilir (9).

VEGF, endotel hücreleri için migratuar özelliği yanı sıra; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan MMPs(matriks metalloproteinazlar) ile u-PA (ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü) ve t-PA(doku tip plazminojen aktivatörü)'nın salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (9).

Anjiyogenik büyüme faktörleri arasında üzerinde en çok durulan faktör olan VEGF'nin gerek farklı tümoral patolojilerle, gerekse non-tümoral romatoid artrit ve osteoartrit gibi romatolojik hastalıklarla, kardiyovasküler iskemik olaylarla, periferel damar hastalıklarıyla, diabetle, endometriozis, preeklampsi ve ovarian hiperstimülasyon sendromu gibi jinekolojik patolojilerle ilişkisi üzerinde son yıllarda çokça durulmaktadır (20).

Kronik bir hipoksi tablosu oluşturan konjenital kalp hastalıkları ile VEGF düzeylerinde meydana gelmesi muhtemel değişikliğin araştırılması, bu hastalık grubunda anjiyogenik bir değişimin tanımlanmasını ve buna dayalı takip ve tedavi protokollerinin geliştirilmesini sağlayabilir.

II.3. MMP(MATRIX METALLOPROTEINASE)

Genel Özellikleri:

“Matriksinler” olarak da adlandırılan MMP’ler, ekstrasellüler matriks yıkımı ve yeniden yapılanmasından sorumlu metal bağlayıcı endopeptidazlardır. Tüm MMP’ler, katalitik bölgelerinde Zn^{+2} içerir ve aktivitelerinin stabilitesi için Ca^{+2} gereklidir (22).

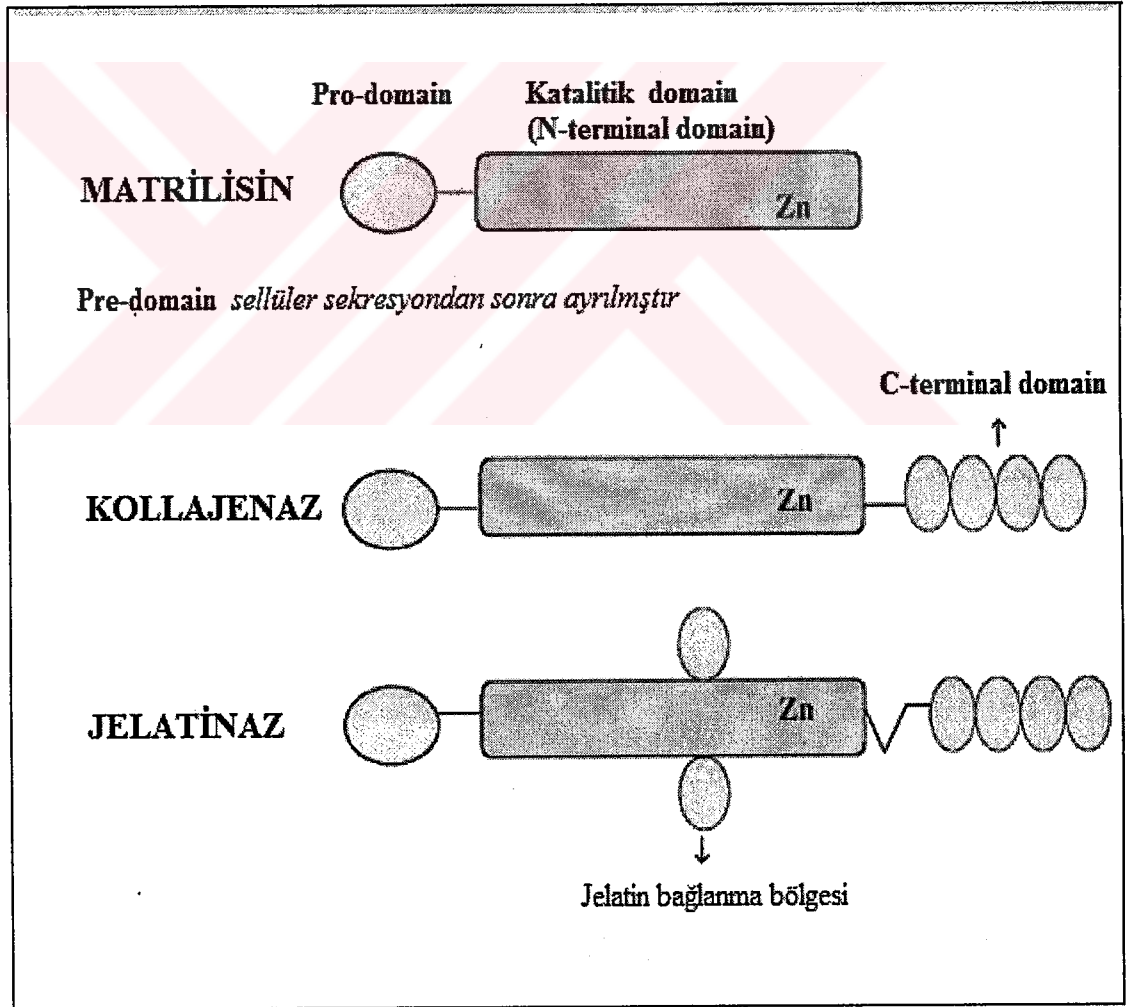
Tüm MMP’ler, adlarına uygun olarak, ECM(ekstrasellüler matriks) yıkımıyla ilişkilidirler. ECM; Tip 4 kollajen, laminin, elastin gibi fibröz proteinler, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardan oluşan özelleşmiş bir bazal membrandır. Tüm dokularda bulunan bu membran, doku komponentleri arasında bariyer görevi görür (23).

Bugüne dek, insanlarda farklı genler tarafından kodlanan ve farklı hücre tipleri tarafından salınan en az 23 farklı MMP ailesi üyesi tanımlanmıştır.

MMP ailesi üyelerinin başlıca karakteristik özellikleri şunlardır:

- %40-80 homolog amino asit içeriği ile yapısal homoloji
- Enzimin katalitik bölgesinde bir Zn^{+2} varlığı
- Proteaz aktivitesi için Ca^{+2} gerekliliği
- Latent zimojenler (pro-MMP) şeklinde inaktif formlarda sentez ve salınım
- Fizyolojik pH değerlerinde ECM komponentlerini yıkabilme kabiliyeti. Tüm MMP’ler matriksin en azından bir komponentini yıkar. Substrat spesifitesi yalnızca bir ECM proteini ile sınırlı olmasa da; her bir MMP spesifik bir substratı ayrıcalıklı olarak yıkar.
- Enzim aktivitelerinin çok sayıda basamakta düzenlenmesi

Tüm MMP'ler yapısal olarak 3 bölge içerir: Bir predomain, bir prodomain ve bir katalitik domain. Predomain, intrasellüler olarak sentezlenen enzimin membrana transferi için gereklidir ve sellüler sekresyondan sonra hızla ayrılır. Prodomain, enzimatik aktivitenin latent formda tutulmasını sağlar ve katalitik bölgedeki sistein rezidüsü içeren peptid zinciri ile etkileşir. Üç boyutlu yapı incelendiğinde sistein rezidüsünden oluşan bölgeye tutunan bir Zn^{+2} vardır. Sistein rezidüsünden Zn^{+2} 'nin ayrılması katalitik bölgenin aktivasyonu ile sonuçlanır. MMP'lerin çoğunda, karboksi-terminal pozisyonda dördüncü bir bölge daha vardır. Bu yapısal bölge vitronektin ve hemopeksinle homoloji gösterir ve MMP'lerin substrat tanınmasıyla ilişkilidir (22,24) (Şekil II.3).



Şekil II.3. MMP'lerin yapısal özellikleri

MMP ailesinin üyeleri; yapıları ve substrat spesifitelerine dayanılarak 5 sınıfa ayrılmıştır. Bunlar:

1)Kollajenazlar:	- MMP-1	İnterstisyel kollajenaz
	-MMP-8	Nötrofil kollajenaz
	-MMP-13	Rodent interstisyel kollajenaz
2)Jelatinazlar:	-MMP-2	Jelatinaz A
	-MMP-9	Jelatinaz B
3)Stromelisinler:	-MMP-3	Stromelisin-1
	-MMP-10	Stromelisin-2
	-MMP-11	Stromelisin-3
4)Membran tip MMP'ler:	-MMP-14	MT-MMP-1
	-MMP-15	MT-MMP-2
	-MMP-16	MT-MMP-3
	-MMP-17	MT-MMP-4
	-MMP-24	MT-MMP-5
	-MMP-25	MT-MMP-6
5)Matrilisinler:	-MMP-7	Matrisilin-1
	-MMP-26	Matrisilin-2
	-MMP-12	Metalloelastaz
	-Diğerleri	MMP-18,23,27,28 (24,25).

MMP-9; MMP ailesinin en büyük üyesidir ve başlıca; nötrofiller, monositler ve makrofajlar tarafından üretilir. Jelatinaz sınıfına dahil olan MMP-2 ve MMP-9, bazal membranın ana komponentlerinden biri olan tip IV kollajeni yıkar. Hem latent, hem aktif formların jelatine yüksek bir afinitesi vardır (24).

MMP'lerin herbiri farklı bir gen tarafından kodlanır ve epitel hücreleri, fibroblastlar, inflamatuvar hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinde üretilirler. Endotel hücrelerde üretildiği gösterilen MMP tipleri ise: MMP-1, MMP-2, MMP-9 ve MT-1-MMP'dir (4).

MMP Sentez ve Aktivitesinin Düzenlenmesi:

MMP'lerin çoğu istirahat halindeki yetişkin dokularında hiç yoktur veya çok az eksprese edilir. Ancak; embriyogenesis, yara iyileşmesi, kemik yeniden yapılanması, menstrüel siklus süresince endometrial damarlanma, plasental damarlanma gibi ECM yeniden yapılanması olan birçok fizyolojik durum yanı sıra; romatoid artrit, diabetes mellitus, tümöral büyüme ve metastaz gibi patolojik durumlarda da MMP ekspresyonu hızla artırılır (24,26).

MMP aktivitesi en az 3 seviyede sıkı bir şekilde kontrol edilir:

- 1) Transkripsiyon,
- 2) Zimojen enzim formunun proteolitik aktivasyonu
- 3) Aktif enzimin doğal inhibitörler aracılığıyla inhibisyonu

Birçok büyüme faktörü, sitokinler ve hormonlar MMP ekspresyonunu transkripsiyon seviyesinde düzenlerler. Proinflamatuvar sitokinler MMP üretimini indükleyebilirken, İnterleukin-10 (IL-10), retinoik asit, glukokortikoidler ve steroidler bazı MMP'lerin ekspresyonunu negatif yönde etkiler (27). MMP'ler, in vivo olarak yeniden yapılanma olayları sırasında dokuyu invaze eden major hücre tipleri yanı sıra, o bölgede bulunan konnektif doku hücreleri tarafından da eksprese edilir (22).

MMP aktivitesinin ikinci kontrol yolu olan enzim aktivitesinin regülasyonu hücre içinde veya dışında meydana gelebilir. Pro-MMP'lerin ekstrasellüler olarak başlıca aktivatörü plazmindir. u-PA'nın sellüler reseptörlere bağlanması yoluyla plazminojenin plazmine, pro-MMP'lerin aktif formlarına hızla aktivasyonu sağlanır (24). MMP aktivitesinin daha sonraki seviyeleri, bir MMP aktivasyonunun diğerlerine yolaçması şeklinde bir geri iletim mekanizması oluşturur. Bu yolla, plazmin, pro-MMP-1, -3 ve -9'u aktif

formlarına çevirir. MMP-1, pro-MMP-9'u aktive edebilir. MT-MMP'ler de özellikle MMP-2 olmak üzere birçok pro-MMP'nin aktivatörüdürler (24).

Doğal endojen inhibitörler aracılığıyla MMP aktivitesinin düzenlenmesi noktasında doku sıvılarındaki başlıca MMP inhibitörü alfa2-makroglobülin'dir. MMP'lere bağlanarak irreversibl bir kompleks oluşturan alfa2-makroglobülin, çöpçü reseptörler aracılığıyla MMP'lerin ortamdan uzaklaştırılmalarını sağlar (26).

Bununla birlikte üzerinde en çok çalışılmış olan MMP inhibitörleri metalloproteinazların doku inhibitörleri olan TIMP ailesidir. TIMP_s(Tissue İnhibitors of Metalloproteinases), moleküler ağırlıkları 21-30 kDa arasında değişen şolubl proteinlerdir. 4 tipi tanımlanmış olan bu proteinler, aktive olmuş MMP'lerle güçlü, reversibl, nonkovalent kompleksler oluşturup, MMP katalitik bölgesini etkileyerek enzim aktivitesini inhibe ederler (25,26,28).

MMP'lerin Biyolojik Etkileri ve Anjiyogenezle İlişkisi:

İn vivo olarak MMP'lerin en büyük görevi; kollajenler, laminin, fibronektin, elastin ve proteoglikan gibi çeşitli ECM proteinlerinin yıkım veya değiştirilmesi yoluyla ECM'in yapısal organizasyonunu kesintiye uğratmaktır. ECM ve bazal membran yıkımı yanında; endotelial hücrelerin migrasyon ve adhezyonunu da uyarırlar. Bu fonksiyonlar anjiyogenez sürecinde yeni kapiller oluşumu ve matriks yeniden yapılanması için gereklidir. Dolayısıyla, MMP'ler anjiyogenezde kritik bir rol oynarlar ve anjiyogenezle birlikte ECM remodelingi olan tüm fizyolojik ve patolojik süreçlere katılırlar (24,27).

Anjiyogenez için MMP gerekliliği kesinlikle tespit edilmiştir. Örneğin; tümörle ilişkili MMP üretimi üzerine bariz azaltıcı etkisi olan TIMP-1 ve TIMP-2'nin artmış ekspresyonu, tümörle ilişkili anjiyogenezi inhibe eder. Ayrıca sentetik MMP inhibitörlerinin antianjiyogenik etki gösterdiğine ilişkin pek çok çalışma vardır. Örneğin; MMP-1, -3 ve -9 inhibisyonu yapan KB-R 7785 ile

tedavi edilmiş farelerde, primer tümör ve metastazlarda artmış hücre apoptozisi ve azalmış damar yoğunluğu gözlenmiştir (25). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar MMP'lerin, ECM'den anjiyostatin ve endostatin gibi anjiyogenez inhibitörlerinin üretimi ve salınımını da sağlayabildiklerini göstermektedir (4).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, MMP'lerin ECM komponentleri yanında, ECM dışı molekülleri de substrat olarak kullandığına dair kanıtlar elde edilmiştir. Bunlar arasında; IGF-BP(Insulin like Growth Factor-Binding Protein), proTGF- β (Transforming Growth Factor- β) gibi büyüme faktör prekürsörleri ve bağlayıcı proteinler; proTNF- α (proTumor Necrosis Factor- α), proIL-1 β (Interleukin-1 β) ve IL-2(Interleukin-2) gibi sitokinler, E-cadherin, β_4 -integrin, syndecan-1, ICAM-1(Intracellular Adhesion Molecule), α_v integrin gibi adezyon reseptörleri vardır. Bu yeni tanımlanan özellikler, MMP'lerin daha önce anlaşıldığından çok daha fazla fizyolojik ve patolojik olayla ilişkili olduğunu öngörmektedir (26).

Bu bulgular, konjenital kalp hastalıklı çocuklarda, hipoksi ve değişen hemodinamik dengelere bağlı olarak meydana gelmesi muhtemel anjiyogenik değişikliklerde MMP'lerin de işe karışabileceğini düşündürmektedir.

II.4. BNP (BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE)

Genel Özellikleri:

BNP, vücuda pompalanan kan miktarının yetersizliği durumunda aktive olan, natriüretik peptid ailesinin bir üyesidir. Natriüretik peptid sisteminde, ventriküler disfonksiyona cevap olarak kalpten ANP (Atrial Natriuretic Peptide) ve BNP (Brain Natriuretic Peptide) olmak üzere 2 farklı peptid sekrete edilir (34).

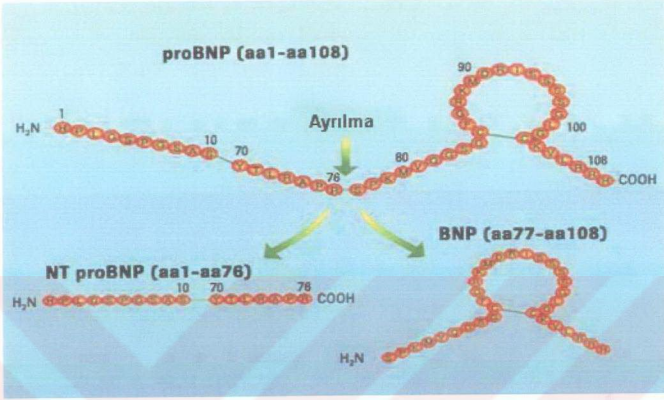
ANP, artmış atrial duvar basıncına cevap olarak atriumda üretilir. İlk kez 1988'de *Sudoh T.* tarafından beyin dokusunda izole edildiğinden dolayı "Brain Natriuretic Peptide" olarak adlandırılan BNP, daha sonra domuz ve rat kalp dokusundan izole edilmiştir (35,36).

Artmış ventriküler volüm yüküne cevap olarak ventriküllerden salınan BNP, konjestif kalp yetmezliği ve sol ventriküler disfonksiyon durumlarında hızla yüksek konsantrasyonlarda üretildiğinden dolayı acil tanı için kullanılmaya elverişli bir kardiyak belirteçtir. Ayrıca, ANP' den daha stabil olup, 5-6 kat daha fazla yarı ömre sahip olan ve sol ventriküler disfonksiyon için daha spesifik olan BNP'nin bazal kardiyak sekresyonu da ANP'den daha azdır (34,37).

İnsan BNP geni 1.kromozamda lokalizedir ve 108 a.a'lik prohormon olan proBNP'i kodlar. NT-Pro-BNP olarak adlandırılan N-terminal bölüm, prohormondan ayrılır ve dolaşımdaki biyolojik aktif form olan BNP kalır (**Şekil II.4**).

İn vitro deneylerden elde edilen verilere göre bu iki subünitin prohormondan ayrılmasını sağlayan proteolitik enzim "*furin*"dir.

İlk ölçüm yöntemleri kompetitif radyoimmünölçümle gerçekleştirilmiş olan NT-proBNP ve BNP'nin ölçümleri bugün için kemiluminesans yöntemlerle rutin olarak yapılabilmektedir (37).



Şekil II.4. BNP'nin fizyolojik yapısı

BNP'nin kandaki yarı ömrü yaklaşık 22 dakikadır ve BNP son 2 saat içinde pulmoner kapiller wedge basıncında meydana gelen değişiklikleri doğru olarak yansıtabilir. Yarı ömrü 120 dakika olan NT-proBNP'nin ölçümüyle ise yaklaşık olarak son 12 saat içerisinde hemodinamik dengede meydana gelen anlamlı değişiklikler hakkında fikir sahibi olunabilir (41). Ayrıca sol ventriküler disfonksiyonlu hastalarda NT-proBNP'nin plazma konsantrasyonları BNP'den 2-10 kat daha fazla yükselir. Bu mekanizmadan peptid seviyeleri arasındaki tanımlanmamış bir relatif değişim, kardiyak sekresyon ve klirens mekanizmalarındaki değişimler sorumlu olabilir. Buna göre, kalp yetmezliğinde daha çok yükselen NT-proBNP, BNP ile karşılaştırıldığında daha iyi bir belirteç olarak kabul edilebilir (42).

Dolaşımdaki BNP'nin en büyük kaynağı kardiyak myositlerdir. Son zamanlarda *Tsuruda ve arkadaşları* tarafından yapılan bir çalışmada kardiyak fibroblastlardan da üretildiği gösterilmiştir (38).

BNP Sentez ve Salınımının Düzenlenmesi:

Kardiyak nörohormonların sentezi için başlıca uyarı kardiyak duvar geriminin artmasıdır. Ayrıca invitro deneysel çalışmalarda parakrin ve endokrin yolla Endotelin 1, NO ve Anjiyotensin II gibi nörohormonların da kardiyak BNP üretimini uyardıkları gösterilmiştir (39,40).

En önemli uyarıcı faktör ventriküler basınç artışı olmasına rağmen egzersiz, hipoksi, myokardial iskemi ve kalp hızı değişiklikleri de BNP üretimi için uyarıcıdır (46,47).

Sağlıklı organizmada kardiyak peptidlerin başlıca kaynağı atrium olmakla birlikte, kronik kalp yetmezliğindeki duvar basıncı artışında ventriküler natriüretik peptid olan BNP'nin üretimi artar (37).

Natriüretik peptidler, NPR(natriüretik peptid reseptör) A, B ve C olarak adlandırılan 3 farklı hücre yüzey reseptörüne bağlanarak biyolojik etkilerini gösterirler. NPR-A ve B reseptörleri yapısal olarak benzerdir ve her ikisi de adrenal bez ve böbreklerde bulunmasının yanında, NPR-A, büyük kan damarlarında, NPR-B ise başlıca beyinde ve hipofiz bezinde bulunur. Bu iki reseptör, natriüretik peptidlerin çoğu biyolojik etkilerine, bir siklik guanilat monofosfat (c-GMP) bağımlı sinyal zinciri üzerinden etki ederek aracılık eder. NPR-C ise guanil siklaz aktivitesinden yoksundur ve G protein aktivasyonu yapan 37 amino asitlik bir stoplazmik bölge içerir. Bu reseptör, vasküler endotel, düz kas, kalp, adrenal bezler ve böbrekler gibi çok geniş bir alanda

lokalize olmuştur. Yapılan çalışmalar, NPR-C'nin natriüretik peptidler için bir klirens reseptörü olduğunu göstermektedir (40,43).

Natriüretik peptidlerin sentez ve salınımı için en önemli düzenleyici faktör plazma konsantrasyonu olmasına rağmen, peptidlerin dolaşımdan uzaklaştırma oranı da çok önemlidir.

BNP klirensi başlıca 2 yolla olur: Nötral endopeptidazlar(NEP) aracılığıyla enzimatik yıkım ve NPR-C aracılığıyla endositoz ve lizozomal yıkım.

NEP, çok çeşitli dokularda geniş bir dağılım gösteren çinko metallopeptidazdır. Natriüretik peptidlerin halka yapısını açarak inaktive eder. NPR-C de çok geniş dağılım alanı gösteren bir klirens reseptörü olup, üzerinde lokalize olduğu hücrelerde natriüretik peptidlerin endositozla hücre içine alınıp lizozomal olarak yıkılmasına aracılık eder (40,44).

BNP'nin Biyolojik Etkileri ve Klinik Kullanımı:

BNP'nin başlıca bilinen biyolojik etkileri;

- diürez, vazodilatasyon, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin inhibisyonu (45).
- sempatik aktivitenin baskılanması (46).
- kardiyak ve vasküler myosit hücrelerin büyümesi ve çoğalmasının inhibisyonu (37).
- kardiyak fibrozis inhibisyonu (40).
- kollajen sentezi inhibisyonu ve MMP ekspresyonunun artırılması (38).

Bu etkilerine bağlı olarak BNP, sıvı hemostazının ve kan basıncının düzenlenmesinde de önemli rol oynar (45).

BNP ölçümünün klinik kullanımına ilişkin olarak çeşitli hastalık gruplarında yapılmış çalışmalar vardır: BNP ölçümü; astım, pnömoni, pulmoner embolizasyon, bronşit, bronşiolit, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi dispne nedeni olan hastalıklardan kalp yetmezliğinin ayırt edilmesinde, nefrotik sendrom veya alt ekstremitelerde venöz yetersizlik gibi ödem oluşturan nedenlerden kalp yetmezliğinin ayırt edilmesinde yardımcıdır (62,48).

BNP plazma seviyeleri kalp yetmezliğinin şiddetini yansıttığı ve pulmoner kapiller wedge basıncı ile korele olduğundan dolayı, seri BNP ölçümleri yetmezlik tedavisinin takibinde de son derece kıymetli bir belirteçtir (49,50). Bunlara ilave olarak, akut koroner sendromlar olarak adlandırılan bir grup kardiyak iskemik olayda, kardiyak transplatasyon sonrası başarının değerlendirilmesinde, hafif-orta şiddetli kalp yetmezlikli hastalarda ani ölüm açısından güçlü bir prognostik faktör olarak üzerinde yoğun çalışmalar yapılan BNP, özellikle kardiyovasküler hastalıkların biyokimyasal olarak değerlendirilmesinde giderek önemi artan bir parametredir (51,52,53).

Kalbin hemodinamik değişikliklerine son derece duyarlı cevap veren ve rutin bir kardiyak belirteç haline gelen BNP'nin konjenital kalp hastalıklarında ve özellikle siyanotik durumlardaki düzeylerinin tespit edilmesi bu hastalık grubunun tedavi ve takibi için klinik biyokimya açısından önemli bilgiler sağlayabilir.

II.5.KONJENİTAL KALP HASTALIKLARI

Tüm doğumsal defektlerin yaklaşık üçte birini oluşturan konjenital kalp hastalıklarının görülme sıklığı genel popülasyonda %0,8'dir. Özellikle son 20 yılda gerek tanıda, gerekse palyatif ve düzeltici cerrahi tedavi yöntemlerinde büyük gelişmeler olmasına rağmen, konjenital kalp hastalıkları halen çocuklarda önemli bir ölüm nedeni olmaya devam etmektedir (54).

Konjenital defektlerin çoğu fetüs tarafından iyi tolere edilir. Ancak doğumdan sonra fetal dolaşımdaki değişikliklere bağlı olarak(foramen ovale ve ductus arteriosusun kapanması) meydana gelen hemodinamik değişiklikler, anatomik bir anormalliğin klinik olarak belirgin hale gelmesini sağlar (54).

Çoğu konjenital kalp hastalığının nedeni bilinmemektedir. Ancak genetik faktörler önemli bir rol oynar. Olguların %13'ünde kromozal anomaliler, %3'ünde tek gen defekti gösterilmiştir. %2-4 olguda çevresel faktörler, annenin hastalıkları ve teratojen ajanlar sorumlu tutulmuştur. Gelişmekte olan ülkelerde ise akraba evliliği önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır (55).

Konjenital kalp hastalıkları için başvuru semptom ve bulguları; anomalinin çeşidine, eşlik eden diğer anomalilere ve yaşa bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Yenidoğan ve infant döneminde siyanoz, respiratuar semptomlar, taşikardi, bradikardi görülebilirken, daha büyük çocuklar ve adolesanlar siyanoz, takipne(>60/dk), dispne, taşikardi(>120 atım/dk), bradikardi(<50 atım/dk), malnütrisyon, senkop, göğüs ağrısı gibi semptom ve bulgularla doktora başvurabilmektedir. Hastaların bir kısmında ise rutin muayene sırasında üfürüm tespit edilmesi üzerine yapılan ekokardiyografik inceleme ile tanı konulmaktadır (56).

Genellikle sağdan sola şant olan durumlar siyanozla birlikteyken; soldan sağa şant olan durumlar artmış pulmoner kan akımı, konjestif kalp yetmezliği ve pulmoner hipertansiyon gelişim riski ile birliktelik gösterir (59).

Siyanoz, redükte hemoglobinin artmış konsantrasyonundan kaynaklanan deri ve müköz membranların mavimsi-mor renk değişikliğidir. Klinik olarak siyanoz, cilt venlerindeki redükte hemoglobin konsantrasyonu 5gr/100 ml'e ulaştığında görülür. Siyanoz, özellikle yenidoğan döneminde olmak üzere konjenital kalp hastalıklı çocuklarda önemli bir başvuru semptomudur. Arteriyal kanın desaturasyonuna bağlı gelişen siyanoz 'santral siyanoz', normal arteriyal oksijen saturasyonunda yavaşlamış kan akımından kaynaklanan siyanoz 'periferel siyanoz' olarak adlandırılır.

Siyanotik konjenital kalp hastalıklarında, desatüre kanın oksijenlenmesini sağlayacak alveolar üniteyi kalp içi sağdan sola şant nedeniyle by-pass ederek geçmesine bağlı olarak siyanoz meydana gelir (57). Siyanoz fizik muayene yanısıra arteriyal kan gazı analizinde oksijen saturasyonu ölçümü ile değerlendirilebilir. Normal bir oksijen saturasyonu $\geq\%95$ olmalıdır. Siyanotik durumlarda arteriyal oksijen saturasyonu azalmıştır (58).

Konjenital kalp hastalıkları fizyolojik gelişimlerine dayalı olarak 4 gruba ayrılır:

1. Darlıkla birlikte olanlar: Aort stenozu
Pulmoner stenoz
Aort kuarktasyonu
2. Sağdan-sola şant olanlar: Fallot tetralojisi
Büyük damarların transpozisyonu
Trikuspid atrezisi
3. Soldan-sağa şant olanlar: Ventriküler septal defekt
Atrial septal defekt
Patent ductus arteriosus
4. Mikst: Trunkus arteriosus
Total anormal pulmoner venöz dönüş
Hipoplastik sol kalp sendromu (58).

En sık görülen siyanotik konjenital kalp hastalıkları: Büyük Arterlerin Transpozisyonu (BAT), Fallot Tetralojisi (TOF), Triküspid Atrezisi (TA), Total Anormal Venöz Dönüş Anomalisi (TAPVR) ve Pulmoner atrezi+ağır pulmoner stenoz ya da pulmoner atrezi+VSD birlikteliğidir (58).

III. MATERYAL VE METODLAR

III.1. MATERYAL:

Bu çalışma, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Pediatrik Kardiyoloji Polikliniğinde tanı alan ve takibi yapılan yaşları 3 ay -16 yaş arasında değişen toplam 46 konjenital kalp hastası üzerinde yapıldı. Tanısı ekokardiyografik olarak kesinleştirilen hasta grubu, fizik muayene bulguları ve kan gazı analizi sonuçlarına göre siyanotik (n=11) ve asiyanotik(n=35) olarak ayrıldı. Kronik bir hastalığı olmayıp akut sağlık problemi ile pediatri polikliniğine başvuran ve hasta grubu ile yaş ve cinsiyet yönünden benzer 29 sağlam çocuk kontrol grubu olarak alındı.

Siyanotik gruba dahil edilen hastalardan 5'inde Fallot Tetralojisi(TOF), 3'ünde A-V Kanal Defekti(Atriyo-Ventriküler Kanal Defekti), 2'sinde TA(Truncus Arteriozus), 1'inde Tek Ventrikül tanısı konulmuştu. Asiyanotik grup içinde 18 hastada VSD(Ventriküler Septal Defekt), 9 hastada ASD(Atrial Septal Defekt), 2 hastada VSD+ASD, 4 hastada PDA(Patent Duktus Arteriosus) ve 2 hastada ASD+PDA vardı.

Hasta ve kontrol grubundan plazma örneklerinin alınması için lityum-heparin ve potasyum-EDTA içeren steril tüpler kullanıldı. Tam kan örnekleri alındıktan hemen sonra 1000×g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazma örnekleri analize kadar -85°C'de saklandı. Bu örneklerden heparinli plazmada VEGF ve MMP-9 düzeyleri, EDTA'lı plazmada ise BNP düzeyleri ölçümü yapıldı.

Hastaların siyanotik ve asiyanotik olarak ayrılması amacıyla gerekli olan kan gazı analizi için ise heparinli enjektör içine alınan tam kan örnekleri kullanıldı. Örnekler alındıktan hemen sonra Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı acil biriminde bulunan kan gazı analizöründe taze örnekten çalışıldı.

III.2. METODLAR:

III.2.1. VEGF Ölçümü:

Plazma VEGF konsantrasyonlarının saptanmasında kantitatif sandviç ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanıldı. (Quantikine R&D Systems, Minneapolis, USA) İnsan VEGF'ine karşı geliştirilmiş spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı bu teknik ile VEGF₁₆₅ düzeyleri tespit edilmektedir.

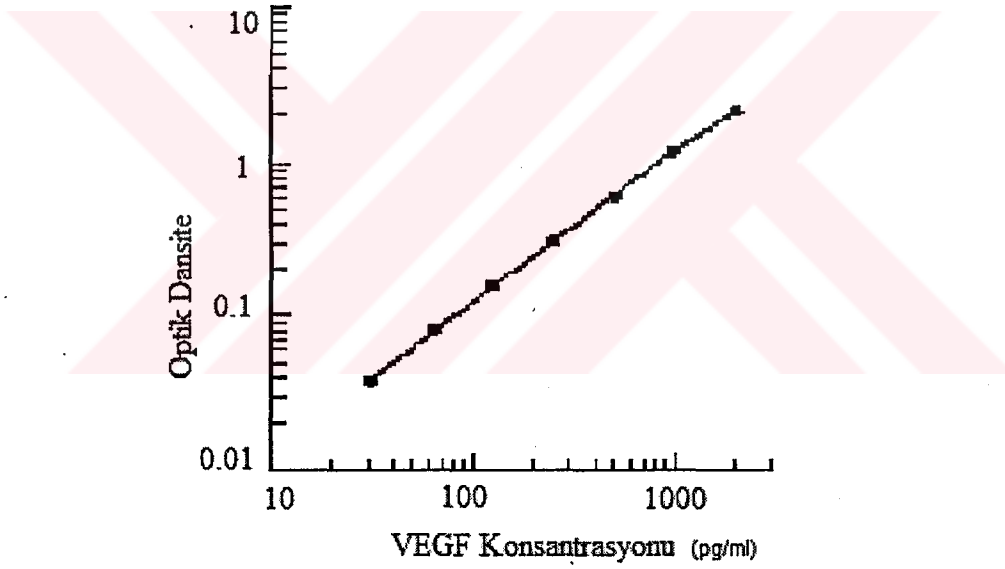
Solid fazlı bir ELISA tekniği olan bu yöntemde rekombinant insan VEGF'ine karşı geliştirilmiş spesifik monoklonal antikorlarla kaplı kuyucuklar içeren mikropate kullanılmaktadır. Ölçümün kalibrasyonunun sağlanması amacıyla 2000pg/ml VEGF içeren standarttan seri dilüsyonlarla hazırlanmış 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 pg/ml'lik 7 standart ve bir adet 0 standart olmak üzere toplam 8 standart kullanılmıştır. Standartlar ve plazma örnekleri için aynı koşullar altında ve eş zamanlı olarak aşağıdaki çalışma prosedürü uygulanarak sonuçlar elde edilmiştir:

- 100µL standart ve plazma örneklerinin tespit edilen kuyucuklara pipetlenmesi ve antikorlara bağlanması için oda ısısında 2 saat inkübasyonu
- Tampon özelliğindeki yıkama solüsyonu ile kuyucukların 3 kez yıkanması ve bu yolla bağlanmayan antijenlerin uzaklaştırılması
- Her bir kuyucuğa VEGF'e karşı geliştirilmiş enzim işaretli poliklonal antikor içeren konjugattan 200µL pipetlenmesi ve immün kompleks oluşması amacıyla oda ısısında 2 saat inkübasyon. Konjugat solüsyonu içerisindeki antikorlar enzim olarak "Horseradish Peroksidaz" la işaretlenmiştir. Bu şekilde, ilk inkübasyon esnasında oluşan antikor-antijen kompleksi üzerine ikinci bir antikor ilavesi ile sandviç kompleks oluşması ve bunun enzimle işaretlenmesi sağlanır.
- Tampon özelliğindeki yıkama solüsyonu ile kuyucukların 3 kez yıkanması ve bu yolla bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması.

- Hidrojen peroksit ve kromojen özellikli tetramethylbenzidine içeren substrat solüsyonundan 200µL pipetlenmesi ve enzim-substrat reaksiyonunun gerçekleşmesi için 25 dakika inkübasyon.
- Enzim-substrat reaksiyonunun durdurulması için 2N sülfürik asit içeren stop solüsyonundan 50 µL pipetlenmesi.
- Oluşan renk reaksiyonunun optik dansitesinin mikropate okuyucu spektrofotometresinde 450nm dalga boyunda okunması.

Sonuçların Hesaplanması:

Sonuçların hesaplanması için kullanılan kalibrasyon grafiği aşağıdadır.:



Grafik III.1. VEGF ölçümü kalibrasyon grafiği

Kullanılan VEGF kitinin analitik Performansı:

Quantikine VEGF ELISA kitinin üretici tarafından tespit edilmiş analitik sensitivitesi 5,0pg/ml olup ölçüm için kesinlik göstergesi olarak CV(Coefficient of Variation) değeri 235 pg/ml'lik örnek için tekrarlanan 20 ölçümde %4,5'dir.

III.2.2.MMP-9 Ölçümü:

Plazma MMP-9 konsantrasyonlarının saptanmasında kantitatif sandviç ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanıldı (Quantikine R&D Systems, Minneapolis, USA).

İnsan MMP-9'una karşı geliştirilmiş spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı bu teknik, solid fazlı bir ELISA ölçümü olup, rekombinant insan MMP-9'u içeren 8 adet standart kullanılarak ölçüm yapılmaktadır. Bu amaçla 20ng/ml MMP-9 içeren standarttan seri dilüsyonlarla hazırlanmış 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.312ng/ml'lik 7 standart ve bir adet 0 standart olmak üzere toplam 8 standart kullanılmıştır. Standart ve plazma örnekleri için aynı koşullar altında ve eş zamanlı olarak aşağıdaki çalışma prosedürü uygulanarak sonuçlar elde edilmiştir:

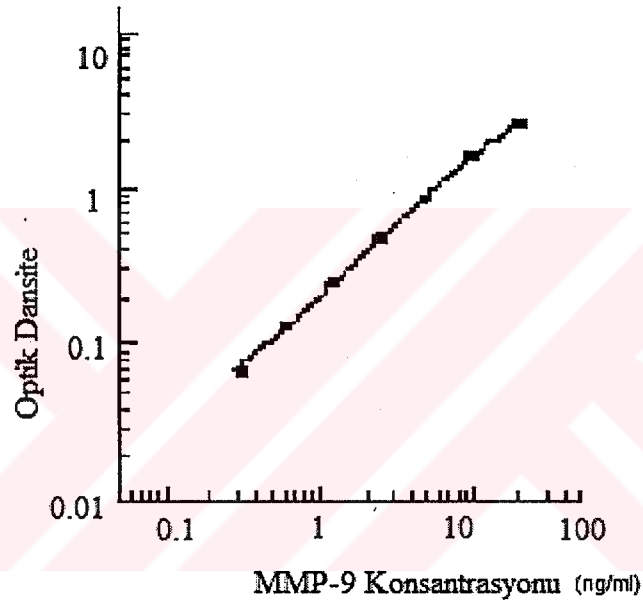
- Plazma örneklerinin 1/40 oranında dilüe edilmesi
- 100 µL standart ve plazma örneklerinin tespit edilen kuyucuklara pipetlenmesi ve antikorlara bağlanması için oda ısısında horizontal orbital karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübasyonu.
- Tampon özelliğindeki yıkama solüsyonu ile kuyucukların 4 kez yıkanması ve bu yolla bağlanmayan antijenlerin uzaklaştırılması.
- Her bir kuyucuğa MMP-9'a karşı geliştirilmiş enzim işaretli poliklonal antikor içeren konjugattan 200µL pipetlenmesi ve immün kompleks oluşması amacıyla oda ısısında horizontal orbital karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübasyon. Konjugat solüsyonu içerisindeki antikorlar enzim olarak "*Horseradish Peroksidaz*"la işaretlenmiştir. Bu şekilde, ilk inkübasyon esnasında oluşan antikor-antijen kompleksi üzerine ikinci bir antikor ilavesi ile sandviç kompleksi oluşması ve bunun enzimle işaretlenmesi sağlanır.
- Tampon özelliğindeki yıkama solüsyonu ile kuyucukların 4 kez yıkanması ve bu yolla bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması.
- Hidrojen peroksit ve kromojen özellikte tetramethyl benzidine içeren substrat solüsyonundan 200µL pipetlenmesi ve enzim-substrat reaksiyonunun gerçekleşmesi için 30 dakika inkübasyon.

- Enzim-substrat reaksiyonun durdurulması için 2N sülfürik asit içeren stop solüsyonundan 50µL pipetlenmesi.

- Oluşan renk reaksiyonunun optik dansitesinin, mikropate okuyucu spektrofotometresinde 450 nm dalga boyunda okunması.

Sonuçların Hesaplanması:

Sonuçların hesaplanması için kullanılan kalibrasyon grafiği aşağıdadır. Sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplanmıştır:



Grafik III.2. MMP-9 ölçümü kalibrasyon grafiği

Kullanılan MMP-9 kitinin analitik performansı:

Quantikine MMP-9 ELISA kitinin üretici tarafından tespit edilmiş analitik sensitivitesi 0,156 ng/ml'dir. Örneklerin 40 kez dilüsyonu ile çalışılmakta olup 1/16 dilüsyon için belirlenmiş linearitesi %103'dür. Kitin ölçüm içi kesinlik göstergesi olarak CV(Coefficient of Variation) değeri 2,04ng/ml'lik örnek için tekrarlanan 20 ölçümde %1,9'dur.

III.2.3.BNP Ölçümü:

Plazma BNP ölçümleri, Elecsys Pro-BNP kiti kullanılarak E170 elektrokemiluminesans İmmunassay analizöründe(Roche Diagnostics, Mannheim, USA) yapılmıştır.

Kemiluminesans, kimyasal reaksiyon sırasında oluşan ışık saçılımıdır. Elektrokemiluminesans ise, yarışmalı ve sandviç immünölçümlerde işaretleyici olarak ruthenyum gibi elektrokemiluminesans moleküllerin kullanıldığı immünölçüm tipidir. Bu tip ölçümlerde ruthenyum(II) tris(bipiridil), elektrod yüzeyindeki tripropilamin ile 620 nm'de elektrokemiluminesans reaksiyona girer. Katı faz olarak manyetik bilyalar kullanılarak, bilyalar elektrod yüzeyinde tutulur ve bağlı olmayan işaretleyici yıkama solüsyonu ile uzaklaştırılır. Bilyaya bağlı işaretleyici, voltaj uygulanması ile elektrokemiluminesans reaksiyona girer ve oluşan ışık yayımı fotomultiplier tüp ile ölçülür (61). Sandviç kompleks oluşumuna dayalı bir immünölçüm olan Elecsys ProBNP ölçümünde oluşan ışık yayımı, analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak analizör tarafından hesaplanır.

BNP Ölçüm Metodunun Analitik Performansı:

Elecsys Pro-BNP kitinin üretici tarafından tespit edilmiş analitik sensitivitesi 5pg/ml'dir. Benzer yapıdaki moleküller ve diğer nörohormonlarla çapraz reaksiyonun araştırıldığı analitik spesifite çalışmasında araştırılan tüm moleküller için çapraz reaksiyon <math><0.001</math> bulunmuştur. Kitin ölçüm içi kesinlik göstergesi olarak tespit edilmiş CV(Coefficient of Variation) değeri 114,5pg/ml'lik örnek için tekrarlanan 21 ölçümde %3'dür.

III.2.4.İstatistiksel Analiz:

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde 'SPSS for Windows 10.0' paket programı kullanıldı. Sonuçlar, ortalama \pm SEM olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırılma tek yönlü Varyans analizi(ANOVA) kullanılarak yapıldı. Korelasyon için Pearson ve Spearman Korelasyon Testi kullanıldı. p değerinin 0.05 değerinin altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

Bu çalışma, 11(7♀, 4♂)siyanotik, 35(21♀, 14♂) asiyanotik konjenital kalp hastalığı olan 46(28♀, 18♂)hasta ve 29(12♀, 17♂) sağlıklı çocukta yapıldı.

Tüm gruplar >3 ay çocuklardan oluşturulmuş olup yaş ortalaması siyanotik grupta 4,3±1,3, asiyanotik grupta 4,3±0,6 ve sağlıklı kontrol grubunda 7,3±0,7 idi.

Konjenital kalp hastalıklı çocuklarda arteryal kan O₂ saturasyonu siyanotik grupta %80,9±7,4, asiyanotik grupta %96,6±2,9 olarak tespit edildi.(p<0.05)

IV.1. VEGF

Konjenital kalp hastalıklı siyanotik ve asiyanotik grupta ve sağlıklı kontrol grubunda ölçülen VEGF değerleri *Tablo IV.1*'de gösterilmiştir.

Tablo IV.1. Sağlıklı Kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma VEGF değerleri (ortalama ± SEM)

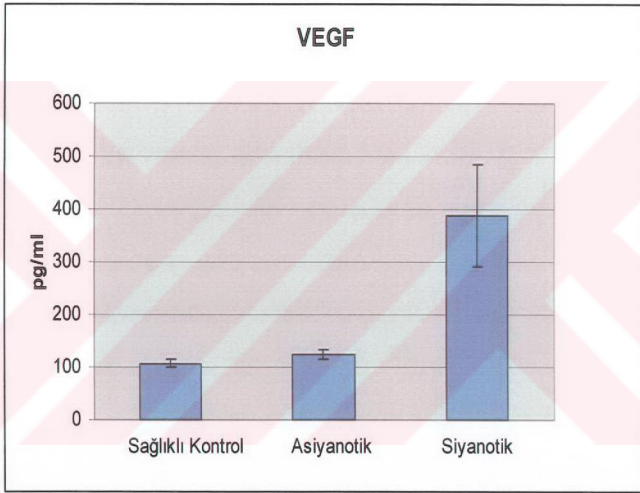
GRUPLAR	VEGF (pg/ml)
Sağlıklı Kontrol Grubu n: 29	107±8
Asiyanotik Grup n: 35	124±9
Siyanotik Grup n: 11	387±97 ^{a b}

a: Sağlıklı Kontrol grubuna göre fark p<0,05

b: Asiyanotik Kontrol grubuna göre fark p<0,05

Siyanotik grup plazma VEGF değerleri (387 ± 97 pg/ml), sağlıklı kontrol grubuna gore(107 ± 8 pg/ml) ve asiyanotik gruba gore (124 ± 9 pg/ml) anlamlı Şekilde yuksek bulundu (her ikisi de $p<0.05$).

Asiyanotik grup plazma VEGF değerleri sağlıklı kontrol grubundan yuksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenemedi ($p>0.05$).



Grafik IV.1. Sağlıklı Kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma VEGF duzeyleri

IV.2. MMP-9

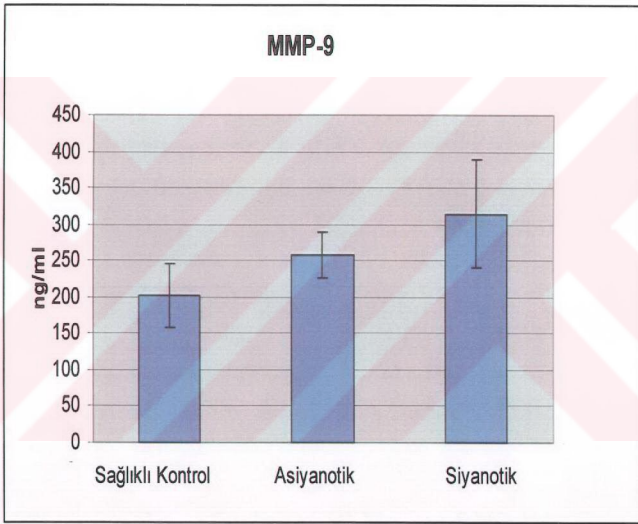
Konjenital kalp hastalıklı siyanotik ve asiyanotik grupta ve sağlıklı kontrol grubunda ölçülen MMP-9 değerleri **Tablo IV.2'**de gösterilmiştir.

Tablo IV.2. Sağlıklı Kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma MMP-9 değerleri (ortalama \pm SEM)

GRUPLAR	MMP-9 (ng/ml)
Sağlıklı Kontrol Grubu n: 29	202 \pm 43
Asiyanotik Grup n: 35	258 \pm 32
Siyanotik Grup n: 11	315 \pm 73

Siyanotik grup plazma MMP-9 değerleri (315 ± 73 ng/ml), asiyanotik gruba göre(258 ± 32 ng/ml) ve sağlıklı kontrol grubuna göre (202 ± 43 ng/ml) yüksek bulunmuş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenemedi (tümü $p>0.05$).

Asiyanotik grup plazma MMP-9 değerleri sağlıklı kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).



Grafik IV. 2. Sağlıklı Kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma MMP-9 düzeyleri

IV.3. BNP

Konjenital kalp hastalıklı siyanotik ve asiyanotik grupta ve sağlıklı kontrol grubunda ölçülen BNP değerleri **Tablo IV. 3'**de gösterilmiştir.

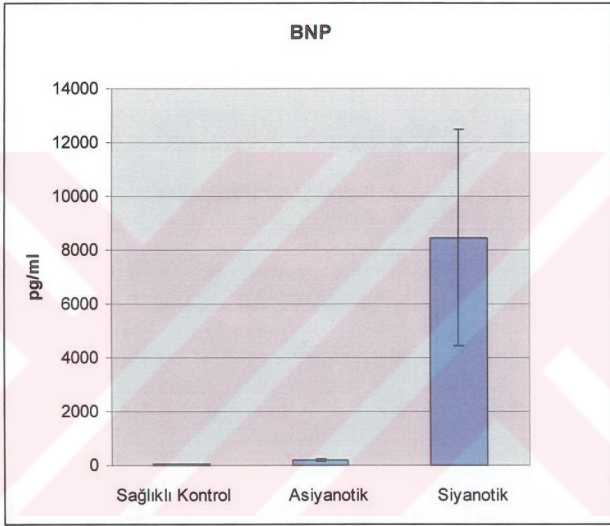
Tablo IV. 3. Sağlıklı Kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma BNP değerleri (ortalama \pm SEM)

GRUPLAR	BNP (pg/ml)
Sağlıklı Kontrol Grubu n: 29	53 \pm 8
Asiyanotik Grup n: 35	185 \pm 45
Siyanotik Grup n: 11	8456 \pm 4031 ^{a b}

a: Sağlıklı Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$

b: Asiyanotik Kontrol grubuna göre fark $p < 0,05$

Siyanotik grup plazma BNP değerleri (8456 ± 4031 pg/ml), asiyanotik gruba gore (185 ± 45 pg/ml) ve sağlıklı kontrol grubuna gore (53 ± 8 pg/ml) anlamlı Şekilde yuksek bulundu (her ikisi de $p < 0.05$). Asiyanotik grup plazma BNP değerleri sağlıklı kontrol grubundan yuksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenemedi ($p > 0.05$).



Grafık IV.3. Sağlıklı Kontrol, Asiyanotik ve Siyanotik grup plazma BNP duzeyleri

Plazma VEGF, MMP-9 ve BNP duzeylerinin ayrı ayrı korelasyonu değerlendirildiğinde siyanotik grupta VEGF-BNP duzeyleri ve MMP-9-BNP duzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmezken (sırasıyla $r = 0,2$; $p > 0,05$, $r = 0,0$, $p > 0,05$), VEGF-MMP-9 duzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi ($r = 0,67$; $p < 0,05$).

Ayrıca, siyanotik grupta plazma VEGF duzeyleri ile arteriyel kan O_2 saturasyonu arasında anlamlı negatif korelasyon vardı ($r = -0,69$; $p < 0,05$).

V.TARTIŞMA

Anjiyogenez aracılığıyla yeni kan damarlarının oluşması, yaşam boyunca birçok fizyolojik işlev için önemlidir. Patolojik koşullarda ise anjiyogenez bazen istenen, bazen istenmeyen bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Örneğin yaraların iyileşmesi, enfarktüste kalpte ortaya çıkan iskemik bölgelerin daha iyi kanlanması ve beslenmesi ya da periferik arteriyel hastalıklarda ve iskelet kaslarında egzersiz sırasında yorgunluğa karşı bir direnç oluşturmaya açısından istenen bir durumdur. Bununla birlikte özellikle tümörlerde, kronik enflamatuar hastalıklarda (romatoid artrit, psöriazis, diyabetik retinopati, arteriyosklerozis) anjiyogenez istenmeyen bir süreçtir (65).

Siyanotik konjenital kalp hastalığında hipoksiye bağlı olarak yeni damar oluşumu görülebilir. Sıklıkla aortopulmoner kollateral arterler gelişir. Bu damarlanma persistan özellikte bir soldan sağa şant gelişmesine sebep olabilir ve bu damarlar bazı cerrahi prosedürlerin uygulanması esnasında sistemik dolaşımın ihtiyacını karşılayan ventrikül üzerindeki hemodinamik yükü artırır. Bu sebeple bu damarlar kardiyak operasyonlardan önce veya sonra transkateter coil embolizasyon yoluyla genellikle kapatılır (2). Bu durum, siyanotik konjenital kalp hastalığında anjiyogenik sürecin cerrahi prosedürleri zorlaştırıcı özellikte olduğunu göstermektedir.

Anjiyogenez gelişiminin fazla veya yetersiz olmasının hastalıkların mortalite ve morbiditesi üzerine etkisinin anlaşılmasıyla, '*terapötik anjiyogenez*' ve '*anti-anjiyogenik tedavi*' kavramları araştırılmaya başlanmıştır.

Terapötik anjiyogenezle ilgili çalışmalar iki hayvan modeli üzerinde yoğunlaşır: Tavşan arka ayak modelinde, femoral arter ligasyonundan sonra intraarteriyel veya intramüsküler olarak VEGF ve FGF verilmesi kollateral kan damarı oluşumunu başlatmıştır. Myokardiyal iskemili domuz ve köpek modellerinde ise,

koroner arter tıkanıldıktan sonra perivasküler veya intrakoroner olarak büyüme faktörleri proteinlerinin verilmesi ile myokardiyal vaskülarizasyonda artış olduğu gösterilmiştir (80).

Anti-anjiyogenik tedaviler, tümör dokusunda gerçekleşen patolojik anjiyogenezin mekanizmalarının anlaşılmasına başlamasıyla yoğunlaşmıştır. Kanserli bir hastada, sadece tümörün etrafındaki damar yapımının bloke edilmesini sağlayacak bir anti-anjiyogenik tedavinin başarılması, etkili ve spesifik bir tedavi sağlayacaktır (81).

Siyanotik konjenital kalp hastalıklarında anjiyogenik sürecin hangi yönde değiştiği ve hangi parametrelerle gözlenebildiğinin gösterilmesi, bu hastalık grubunda yeni tedavi arayışlarının önünü açabilir.

Biz bu tez çalışmasında, persistan özellikteki kronik hipoksinin, siyanotik konjenital kalp hastalıklı çocuklarda anjiyogenik faktörleri indükleyebileceği hipotezinden yola çıkarak anjiyogenezin biyokimyasal ölçümlerle gösterilmesi amacıyla plazma VEGF ve MMP-9 düzeylerini ölçtük. Ayrıca aynı hasta grubunda plazma BNP düzeylerini değerlendirmeyi ve anjiyogenezin biyokimyasal göstergeleri ile korelasyonunu araştırmayı amaçladık.

Hipoksinin VEGF ekspresyonunu uyardığı, hiperoksinin ise azalttığına ilişkin olarak son yıllarda çok sayıda deneysel çalışma yayınlanmıştır. Örneğin; *Minchenko ve arkadaşları* hipoksinin in vitro olarak gerek malign hücre kültürlerinde, gerekse fibroblast ve endotelial hücre kültürlerinde VEGF ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. İn vivo deneysel çalışmalarda da, hipobarik O₂'e maruz bırakılan ratlarda hipoksinin VEGF ekspresyonu için potent bir uyarıcı olduğunu göstermişlerdir (8).

Hipoksiye cevap olarak salınan HIF-1a proteini periferik kan dolaşımında bulunmaz, ancak hipoksik bir durumu takiben ilk 24 saat içinde etkilenen bölgede HIF-1a mRNA seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. *Lee ve arkadaşları*, myokardial iskemide

VEGF-A cevabını değerlendirmek için yaptıkları bir çalışmada, VEGF-A ekspresyonunu HIF-1a'dan daha uzun süre devam ettiğini gstermişlerdir (60).

NO inhalasyonu ve hiperoksinin, akciğerdeki VEGF ekspresyonu üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada; NO ve O₂ inhalasyonu yapılan domuz akciğerlerinde VEGF mRNA dzeylerinde anlamlı azalma olduğu gsterilmiştir (63). Benzer sonuçlar 24 veya 48 saat hiperoksiye maruz bırakılan rat akciğerlerinde de gzlenmiştir (64). Bu deneysel çalışmalar, hipoksinin VEGF üzerinde gl bir uyarıcı etkisi olduğunu gstermektedir.

29 sağlıklı kontrol, 35 asiyanotik ve 11 siyanotik konjenital kalp hastalıklı ocuk üzerinde yaptığımız bu çalışmada, siyanotik grup plazma VEGF dzeylerini hem sağlıklı kontrol grubuna gre, hem de asiyanotik gruba gre anlamlı şekilde yüksek olduğunu tespit ettik (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.05$).

Bu bulgular *Himeno ve arkadaşlarının* 80 siyanotik konjenital kalp hastası ve 81 sağlıklı kontrol üzerinde yaptığı çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir (12). Ayrıca siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalıklı gruplar arasında anlamlı farklılığın gsterilmesi, hipoksinin etkisine vurgu yapmaktadır.

VEGF'nin embriyonik vaskülogenez ve anjiyogenezdeki önemini gstermek için yapılan iki ayrı çalışmada, farelerde tek VEGF allel inaktivasyonunun 11-12. günlerde embriyonik lmle sonuçlandığı tespit edilmiştir (82). Kardiyovasküler sistemin embriyonik gelişimi esnasında yüksek dozda büyüme faktrleri uygulanmasının yapacağı etkiyi gstermek için yapılan bir başka çalışmada, bu dnemde VEGF uygulanmasının kalpte yetmezlikle karakterize çok ciddi defektler meydana getirdiği grlmştir. Hemen tüm organlarda venz dilatasyon oluşurken, endokardiyal hücre proliferasyonu artmış, myokardiyum aşırı derecede incelmiş ve ciddi septal defektler meydana gelmiştir (83). Bu alışmalar, sağlıklı embriyonik gelişim için VEGF ekspresyonunun çok ciddi kontrol edildiğini gstermektedir.

Normal sağlıklı yeni doğanlarda plazma VEGF seviyeleri yüksektir ve doğumdan sonraki birkaç ay içinde yavaş yavaş normal seviyelerine düşer. *Malamitsu-Puchner ve arkadaşları* erken yenidoğan döneminde plazma VEGF seviyelerinin ileri çocukluk dönemlerine göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu bildirmişlerdir (66). Bu durum, erken yenidoğan dönemindeki fizyolojik damar gelişimiyle ilişkili olabilir. Ayrıca doğum esnasındaki geçici hipoksiye veya pulmoner kan akımı artışı gibi doğum sonrası gözlenen ani hemodinamik değişikliklere bir cevap olabilir (12).

Konjenital kalp hastalıklı çocuklar ve yenidoğanlarda plazma BNP düzeylerinin değerlendirildiği bir çalışmada, yenidoğan döneminde BNP düzeylerinin de daha sonraki çocukluk dönemlerine göre yüksek olduğu gösterildiğinden dolayı, 3 aydan küçük çocukları çalışmamıza dahil etmedik (67).

Ancak yine de, hasta yaş gruplarına göre VEGF düzeylerinin değişiklik göstermesi, konjenital hastalık alt grubunda hemodinamik dengelerin ve anatomik yapının değişmesi nedeniyle VEGF düzeylerinin etkilenmesi ve hasta sayısının sınırlı olması gibi nedenler geniş standart hata değerlerine ve anlamlı farklılık olmamasına yol açmış olabilir.

Hipoksinin derecesi ile VEGF düzeyleri arasındaki korelasyonun değerlendirildiği bir çalışmada, bu iki parametre arasında anlamlı korelasyon gösterilmezken; *Himeno ve arkadaşlarının* yaptığı iki ayrı çalışmada, arteriyel kan oksijen saturasyonu ile VEGF düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyon gösterilmiştir (1,2,68).

Bizim çalışmamızda da siyanotik hasta grubunun arteriyel kan oksijen saturasyon değerleri ile plazma VEGF düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyon tespit ettik ($r=-0,69$, $p<0,05$).

Siyanotik konjenital kalp defektlerinde cerrahi girişimle ilgili mortalite ve morbidite, nonsiyanotik kalp hastalarına göre daha fazladır. Hipoksi, myokardial metabolizma ve fonksiyonlar üzerinde uzun süreli derin etkiler yapabilir. Kronik hipoksi koroner vazodilatasyonu indükler. Hipoksiyle oluşan bu vazodilatasyon etkisi muhtemelen NO salınımı ile ilişkilidir (69).

Anjiyogenik sürecin gerçekleşmesi için MMP'lerin gerekliliği bugün için kesinlikle tespit edilmiştir. MMP'ler, çeşitli ECM proteinlerinin yıkımı ve değiştirilmesi yoluyla, anjiyogeneizde kritik bir rol oynarlar (25).

En önemli anjiyogenik büyüme faktörlerinden birisi olan VEGF ile MMP'ler arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılmış bazı çalışmalar vardır. *Lamoreaux ve arkadaşları* tarafından yapılan bir çalışmada, VEGF'nin insan dermal mikrovasküler endotel hücrelerinde MMP-2 ve MT-1 MMP salınımını artırdığı, TIMP-1 ve TIMP-2'yi azalttığı gösterilmiştir (71).

Zucker ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada da, VEGF'nin insan umbilikal ven endotel hücrelerinde MMP-1, MMP-2 ve TIMP-1' i artırdığı gösterilmiştir (70).

Son yıllarda, MMP'lerin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmalarda artış olmuştur. Örneğin; bir çalışmada, MMP'lerin arteriyel intima hiperplazisini başlatma, ilerlemiş aterosklerotik lezyonu zayıflatma ve rüptürüne yol açma üzerine major bir etkisi olduğunun farkına varılmıştır (30). Yine son zamanlarda yapılan çalışmalarla, MMP ekspresyonu ve aktivitesindeki artışın aterosklerotik plakların oluşumunda önemli bir rol oynadığı, konjestif kalp yetmezlikli hastalarda plazma MMP-9 düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiştir.

MMP'lerin anjiyogenez ve ECM yıkımı üzerinde etkileri normal akciğer gelişimi sırasında maruz kalınan oksijen miktarına bağlı olarak da değişmektedir. Yenidoğan ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, hiperoksiye maruz kalma ile MMP-9 ve pro-MMP-9 seviyelerinin anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (31,32,33).

Oksijenizasyon ve MMP-9 düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla yenidoğan ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 4-14 gün süreyle %95'lik oksijene maruz bırakılan ratların hem akciğer dokusunda, hem de bronkoalveolar lavaj sıvısında MMP-9 mRNA ve proMMP-9 protein düzeylerinde anlamlı azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, hiperoksinin MMP-9 düzeyleri üzerinde inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir (33).

Malign tümör dokuları hızlı büyümelerinden dolayı genellikle hipoksiye maruz kalırlar. Pankreatik kanser hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada, hipoksik koşullar altında MMP-2 aktivitesi değişmezken, MMP-9 aktivitesinin yaklaşık 5,5 kat arttığı gösterilmiştir (79).

Hipoksinin MMP-9 düzeyleri üzerine in vivo olarak nasıl etki yaptığına ilişkin klinik bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olmasına rağmen; mevcut bilgiler, siyanotik konjenital kalp hastalığındaki kronik hipoksi durumunda MMP-9 düzeylerinin artmasının bekleneceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda, plazma MMP-9 düzeyleri, siyanotik konjenital kalp hastalıklı grupta, asiyonotik ve sağlıklı kontrol gruplarına göre artmış olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir (tümü $p>0.05$)

MMP'lerin salınımının ve aktivitesinin hipoksi dışında anjiyogenik sitokinler aracılığıyla da, hücre tipine bağımlı şekilde değişen bir cevapla düzenlendiği gösterilmiştir.(23) Sitokin ekspresyonunun bireysel değişkenlik göstermesi, anjiyogenik

cevabın bireyler arasında farklılık göstermesinin bir nedeni olabilir (20). Bu sebeple MMP-9 sonuçlarında, yüksek standart hata değerleri ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükseklik gözlenmiş olabilir.

Bu çalışmada, anjiyogenik değişimi biyokimyasal olarak göstermek amacıyla ölçtüğümüz VEGF ve MMP-9 düzeyleri hipoksi, hipoksinin derecesi, sitokinler, hormonlar, yaş, mevcut başka patolojilerin oluşturduğu bireysel değişkenler gibi çok çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu durum, her iki parametre için de kronik hipoksinin yaptığı etkiyi gözlemlemenin önünde sınırlandırıcı bir faktör olarak bulunmaktadır.

Hasta gruplarının özelliklerinin çok daha standardize olduğu (tek tip konjenital kalp hastalığı, beraberinde kardiyak hemodinamiği etkileyecek başka bir patoloji bulunmaması gibi) ve hasta sayısının daha yüksek olduğu çalışmalarla hipoksinin konjenital kalp hastalıklı çocuklardaki anjiyogenik etkisi daha net olarak gözlemlenebilir.

Bu sınırlayıcı faktörlere rağmen, bizim çalışmamızda siyonotik grupta plazma VEGF ve MMP-9 düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit ettik. ($r=0,67$, $p<0,05$)

BNP, ventriküler myositlerden ve fibroblastlardan, basınç ve volüm yüklenmesine cevap olarak salınan kardiyak bir nörohormondur. Konjestif kalp yetmezliği ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalar neticesinde, bu hastalık grubunun tanı, risk değerlendirmesi ve tedavi takibinde yararlı bir belirteç olarak yerini almıştır. Konjenital kalp hastalıklı çocukların değerlendirilmesi ve tedavi takibinde ise BNP'nin rolü henüz çok açık değildir (3).

Plazma BNP seviyelerinin sağlıklı bireylerdeki düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, çocukluk yaş grubunda erişkinlerden anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur (72).

Bir başka çalışmada, BNP düzeylerinin sağlıklı çocuklarda doğumu takiben en yüksek seviyelerde olduğu ve yaklaşık 3 ayda erişkin seviyelerine yaklaştığı gösterilmiştir (73). Bu durum fetal dolaşımdan neonatal dolaşıma geçişle meydana gelen hemodinamik değişikliklerle ilgili olabilir. Fetal dolaşımın sonlanmasıyla birlikte sol ventriküler volüm yükünde akut bir artış vardır. Doğum sonrası BNP seviyelerindeki hızlı artış bu değişimle açıklanabilir (3).

Cowley ve arkadaşları tarafından 96 konjenital kalp hastalıklı çocuk üzerinde yapılan büyük bir çalışmada, tanı ve tedavi amaçlı kardiyak kateterizasyon uygulanan hastalarda plazma BNP düzeyleri ölçülmüştür. Siyanotik, asiyanotik, kalp yetmezliği olan ve olmayan heterojen bir hasta grubunda yapılan bu çalışmada arteriyel O₂ saturasyonu ile BNP konsantrasyonu arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmezken, en güçlü korelasyon sol ventrikül çıkışında obstrüksiyon yapan aort stenozlu hastalarda gözlenmiştir. Bu çalışmanın neticesinde, tedavi girişimi uygulanan hastalar için BNP'nin tekrarlayan ölçümlerinin, kardiyak stresin direkt fizyolojik bir belirteci, terapötik girişimin faydalı olmasının ve ilave bir tedavi ve girişime ihtiyaç olup olmadığının bir göstergesi olabileceği görüşüne varılmıştır (3).

Aynı çalışmada(3) ve *Nagaya ve arkadaşları* tarafından yapılan bir başka çalışmada (75), izole ASD'li asemptomatik hastalarda normal BNP seviyeleri olduğu gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda, asiyanotik konjenital kalp hastalıklı grupta sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BNP düzeyleri artmış olmasına rağmen anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Bu bulgu, önceki paragrafta bahsedilen çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. Zira asemptomatik hasta grubumuzun çoğunluğu izole ASD ve VSD'si

olan, ek bir kardiyak patolojisi ve semptomu olmayan hastalardan oluşmaktaydı. Bu durum, asiyanotik ve asemptomatik kalp hastalıklarında hemodinamik dengenin büyük ölçüde korunmasına bağlı olarak plazma BNP'sinin sağlıklı kontrollerden anlamlı olmayan bir yükselme gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çocukluk yaş grubunda, konjestif kalp yetmezliği veya akciğer hastalıklarına bağlı solunum problemlerinin etyolojisinin anlaşılmasında da BNP ölçümü yararlı bir belirteçtir. Yapılan bir çalışmada 40 pg/ml'nin üzerindeki plazma BNP değerlerinin çocukluk yaş grubunda konjestif kalp yetmezliğini pulmoner hastalıktan %84 doğrulukla ayırt ettiği gösterilmiştir (74).

Hipoksi ve BNP ilişkisini araştırmak amacıyla yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, kısa süreli iskemi ve hipoksi epizodlarının kardiyak dokudan hızla BNP salınımını artırdığını göstermektedir. Örneğin, izole kalp dokusunun hipoksik perfüzyona uğratıldığı deneysel bir çalışmada, koroner dolaşımında uzaklaştırılan kanda BNP aktivitesinin hızlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (76). Anstabil anjinalı hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada da, anjina ataklarından sonra plazma BNP konsantrasyonlarının 4-5 kat arttığı tespit edilmiştir (77).

Siyanotik konjenital kalp hastalıklı çocuklarda BNP düzeylerinin değerlendirilmesine ilişkin olarak literatürde herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Ancak *Hopkins ve arkadaşları* tarafından siyanotik konjenital kalp hastalıklı erişkin hastalarda yapılan bir çalışmada, hipoksinin kardiyak myositlerden BNP salınımı için direkt bir uyarıcı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, total vücut sıvı hacminin hesaplamaya dayalı bir yöntemle ölçülmesinden sonra, siyanotik konjenital kalp hastalıklı erişkinlerde azalmış vücut sıvısına rağmen asiyanotik hastalarla karşılaştırıldığında BNP düzeylerinin bariz yükseldiği tespit edilmiştir (78).

Bizim çalışmamızda siyanotik konjenital kalp hastalıklı grupta, hem sağlıklı kontrollere göre hem de asiyanotik hasta grubuna göre anlamlı yüksek plazma BNP düzeyleri tespit ettik (tümü $p<0,05$).

Bu sonuç, kronik hipoksinin BNP üzerine uyarıcı bir etkisi olduğu hipotezini doğrulamasına rağmen; klinik tanıları açısından heterojen bir hasta grubunda çalışılmış

olması nedeniyle, BNP salınımı üzerine etki gösterebilecek diğer faktörlerinin elimine edildiği daha geniş hasta serilerinde çalışmanın tekrarlanması yararlı olacaktır.

BNP'nin diürez, vazodilatasyon, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin inhibisyonu, sempatik aktivitenin baskılanması gibi sıvı hemostazı ve kan basıncı üzerine olan etkilerinin yanı sıra; son yıllarda kardiyak fibrozis inhibisyonu, kollajen sentezi inhibisyonu ve MMP ekspresyonunun artırılması gibi etkileri olduğu ile ilgili veriler yayınlanmıştır. *Tsuruda ve arkadaşları* tarafından yapılan bir çalışmada kardiyak fibroblast hücre kültürlerinde BNP'nin kollajen sentezini azalttığı ve MMP-1, -2 ve -3 protein ekspresyonunu ve MMP-2 salınımını artırdığı gösterilmiştir (38).

Bizim çalışmamızda siyanotik hasta grubunda hem VEGF, hem MMP-9 hem de BNP düzeylerinin arttığı görülmüştür. Ancak sadece VEGF ve MMP-9 düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Diğer parametrelerin anlamlı korelasyon göstermemesi her 3 parametrenin de çok sayıda fizyolojik ve patolojik faktörden etkilenmesi, hasta sayısının sınırlı olması ve yüksek hata oluşumuyla ilişkili olabilir.

Siyanozun anjiyogenezle ve BNP düzeyleri ile ilişkisinin tespit edilmesi, yapılan medikal ve cerrahi tedavilerin etkinliğini değerlendirme ve tedavi takibinde anjiyogenik biyokimyasal belirteçlerin ve BNP'nin kullanılması yönünde gelecekte yeni ufuklar açabilir.

VI.SONUÇ

Bu çalışmada, anjiogenezle ilişkili faktörlerden VEGF ve MMP-9 ile kardiyak bir nörohormon olan BNP'nin konjenital kalp hastalıklarındaki düzeyleri ve siyanotik konjenital kalp hastalıklarında kronik hipoksiyle ilişkisi incelendi. Bu üç parametrenin plazma düzeyleri 11 siyanotik, 35 asiyanotik konjenital kalp hastalıklı ve 29 sağlıklı çocukta ölçüldü ve aralarında korelasyon olup olmadığı araştırıldı. Hipoksinin derecesi ile bu parametrelerde anlamlı bir değişim meydana gelip gelmediğini göstermek için plazma düzeyleri , arteriyel kan oksijen saturasyonu ile karşılaştırıldı. Şu sonuçlar elde edildi:

1. Plazma VEGF düzeyleri siyanotik hasta grubunda, asiyanotik gruba ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). Asiyanotik grupta plazma VEGF değerleri sağlıklı kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen, istatistiksel düzeyde anlamlılık saptanamamaktadır ($p>0.05$).

2. Asiyanotik ve siyanotik hasta gruplarında plazma MMP-9 düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (sırasıyla $p>0.05$, $p>0.05$). Plazma MMP-9 düzeyleri siyanotik ve asiyanotik hasta grupları arasında da anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$).

3. Plazma BNP düzeyleri, siyanotik hasta grubunda, asiyanotik ve sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). asiyanotik grup plazma BNP düzeyleri, sağlıklı kontrol grubunda yüksek olarak tespit edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$).

4. Siyanotik grup plazma VEGF düzeyleri ile arteriyel kan oksijen saturasyonları arasında anlamlı negatif korelasyon tespit edildi ($r=-0.69$, $p<0.05$).

5. Plazma VEGF, MMP-9 ve BNP düzeyleri arasında her hasta grubunda ayrı ayrı korelasyon değerlendirmesi yapıldığında siyanotik grupta VEGF ve MMP-9 düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi ($r=0.67$, $p<0.05$).

Elde edilen bu sonuçlara göre, siyanotik konjenital kalp hastalığında plazma VEGF düzeylerindeki yükselmenin , bu hastalarda kronik hipoksi etkisiyle anjiyogenez oluşumuna işaret ettiği söylenebilir. Ayrıca VEGF düzeylerindeki yükselme, hipoksinin artmasıyla doğru orantılıdır.

Bugüne dek kalp yetmezliği için biyokimyasal bir belirteç olarak üzerinde durulan BNP'nin kronik hipoksi etkisiyle arttığı görülmüştür. Ancak anjiyogenik faktörler ile BNP arasında bir ilişki gözlenmemiştir. Bu parametrelerin konjenital kalp hastalıklarında tanı ve tedavi girişimleri sırasında yol gösterici olarak kullanılabilmesi için daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

VI. KAYNAKLAR

1. Yoshio O., Masahiro Y., et al.:Vascular endothelial growth factor in children with congenital heart disease. *Ann Thorac Surg*; 75:1523-1526, (2003)
2. Himeno W., Akagi T., Fururi J.:Increased angiogenic growth factor in cyanotic congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*; 24:127-132, (2003)
3. Cowley CG., Bradley JD., Shaddy RE.: B-type natriuretic peptide levels in congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*; 25:336-340, (2004)
4. Stetler WG.: Matrix metalloproteinases in angiogenesis; a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*; 103:1237-1241, (1999)
5. Timothy DH., Brian HA., George RM.: Vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation*; 107:1359-1365, (2003)
6. Folkman J., Klagsbrun M.: Angiogenic factors. *Science*; 235:442-447, (1987)
7. Michael J.B. Kutryk, Duncan J. Stewart: An emerging technology for the treatment of CAD. *Perspectives in Cardiology*, (2001)
8. Minchenko A., Bauer T., Salceda S., Caro J.:Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest*; 71:374-379 (1994)
9. Ferrara N., Davis-Smyth T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*; 18:4-25, (1997)
10. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z.:Vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptors. *The FASEB J*; 13:10-22, (1999)
11. Detmar M.:Tumor angiogenesis.*JID symposium proceedings*; 5:20-23, (2000)
12. Kliche S., Waltenberger J.:VEGF receptor signalign and endothelial function. *JUBMB Life*; 52(1-2):61-66, (2001)

13. Dvorak HF., Brown LF., Detmar M., et al.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol*; 146:1029-1039, (1995)
14. Wolfgang J.: Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem*; 47:617-623, (2001)
15. Soker S., Takashimo S., Miamo H.: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*; 92:735-745, (1998)
16. Abman, Steven: Vascular endothelial growth factor: Not only for vessels anymore. *Pediatr Res*; 53:1-2, (2003)
17. Brogi E., Wu T., Namiki A., Isner JM.: Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and FGF expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*; 90:649-652, (1994)
18. Starnes SL., Duncan BW., Kneebone JM., et al.: Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in children with cyanotic congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 119:534-539, (2000)
19. Longo R., Sarmiento R., Fanelli M., et al.: Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis*; 5:237-256, (2002)
20. Hoeben A., Landuyt B., Highley M.S., Wildiers H., Van Oostterom A.T., de Bruijn E.A.: Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev*; 56:549-80, (2004)
21. Dvorak HF. Et al.: Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 57:673-686, (1987)
22. Souza A., Line S.: The biology of matrix metalloproteinases. *FOB Rev.* Vol:10;1:1-6, (2002)

23. Nelson RA., Fingleton B., Rothenberg ML., Matrisian LM.: Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*; Vol:18; 5:1135-1149, (2000)
24. Beaudoux J., Giral P., Bruckert E.: Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med.*; 42(2):121-131, (2004)
25. Michael S. Pepper: Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator- Plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 21:1104-1117, (2001)
26. Stamenkovic I: Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*; 200:448-464, (2003)
27. Smutzer G: Matrix metalloproteinases and their inhibitors play key roles in tissue remodelling and pathogenesis of metastatic and inflammatory diseases. *The Scientist*; 16(4):34-37, (2002)
28. Amano S., Akutsu N., Matsunaga Y., et al.; Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res*; 271: 249-262, (2001)
29. Sternlicht MD., Werb Z.: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Biol*; 17:463-516, (2001)
30. Bobik A., Tkachuk V.: Metalloproteinases and plasminogen activators in vessel remodelling. *Curr Hypertens Rep.*;5:466-472, (2003)
31. Li D., Liu L., Chen H., et al.: LOX-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*; 107:612-617, (2003)
32. Wilson EM. et al.: Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail*; Vol:8; 6:390-398, (2002)
33. Hosford GE., Xin Fang, Olson DM.: Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: Association with arrested alveolarization. *Pediatr Res*; 56:26-34, (2004)

34. Wiecezorek SJ. et al.: A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately Diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: A multicenter evaluation. *Am Heart J*; 144(5):834-839, (2002)
35. Sudoh T., Kangawa K., Minamino N., Niatsuo H.: A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*; 332:78-81, (1988)
36. Nakao K., Itoh H., Kambayama Y. et al.: Rat brain natriuretic peptide: Isolation from rat heart and tissue distribution. *Hypertension*; 15:774-778, (1990)
37. Hall C.: Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail*; Vol:6; 3:257-260, (2004)
38. Tsuruda, Tashihiro et al.: Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ.Res*; Vol:91; 12:1127-1134, (2002)
39. Harada M., Saito Y., Kuwahara K., et al.: Interaction of myocytes and non-myocytes is necessary for mechanical stretch to induce ANP/BNP production in cardiocyte culture. *J Cardiovasc Pharmacol*; 31:357-359, (1998)
40. Vanderheyden M., Bartunek J., Goethals M.: Brain and other natriuretic peptides: Molecular aspects. *Eur J Heart Fail*. Vol:6; 3:261-268, (2004)
41. McCullough PA., Omland T., Maisel AS.: B-type natriuretic peptides: a diagnostic breakthrough for clinicians. *Rev Cardiovasc Med*; 4:72-80, (2003)
42. Hunt PJ., Richards AM., Nicholls MG., et al.: Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker for cardiac impairment. *Clin Endocrinol(Oxf)*; 47:287-296, (1997)
43. Kone BC.: Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*; 51:429-441, (2001)
44. de Lemos JA., McGuine DK., Drazner MH.: B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet*; 362:316-322, (2003)

45. Hervas I., Osca J., Perez-Pastor JL., et al.: Radioimmunoassay of natriuretic peptide type-B(BNP) in heart failure. *Nucl Med Commun*; Vol;24(1):61-69, (2003)
46. Ruskoaho H., Vuolteenaho O.: Regulation of Atrial Natriuretic Peptide Secretion. *Am Physiol Soc*; Volume.8; 261-66, (1993)
47. D'Souza SP., Yellon DM., Martin C., et al.: B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via KATP channel opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 284:1592-1600, (2003)
48. Bayes-Genis A. et al: N terminal probrain natriuretic peptide (NT-proBNP) in the emergency diagnosis and in-hospital monitoring of patients with dyspnoea and ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail*; Vol:6; 3:301-308, (2004)
49. Richards M., Troughton RW.: NT-proBNP in heart failure: therapy decisions and monitoring. *Eur J Heart Fail*; Vol:6; 3:351-354, (2004)
50. Wu Alan HB., Smith A.: Biological variation of the natriuretic peptides and their role in monitoring patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*; Vol:6; 3:355-358 (2004)
51. Omland T., Persson A., O'Brien R. et al.: N-Terminal Pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*; Vol:106(23): 2913-2918, (2002)
52. Mehra MR. et al: Cardiac transplant function rapidly assessed by BNP assay. *Am J. Cardiol*; 90:1326-1329, (2002)
53. Berger R., Huelsman M., Strecker K., et al.: B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation*; Vol:105(20):2392-2397, (2002)
54. Behrman RE., Kliegman RM., Jenson HB. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 16th Ed. Chapter 428; Section 3; 1362-1363. Philadelphia, Pennsylvania (2000)
55. Clark EB.: Etiology of congenital cardiovascular malformations: epidemiology and genetics. In: Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll DJ. *Moss and*

- Adams heart disease in infants, children and adolescents including the fetus and young adult. 16th Ed. Vol.1:65-79 Philadelphia (2001)
56. Lauer RM.: Symptoms of Cardiovascular Disorders. In: Laurence Finberg. Saunders Manual of Pediatric Practice. 1st Ed. Part XII 532-533 Philadelphia, Pennsylvania (1998)
57. Park MK. Pediatric Cardiology for Practitioners. Mosby-Year Book Inc; 114-127 Baltimore (1996)
58. Brook MM.: The Cardiovascular System. In: Richard E. Behrman, Robert M. Kliegman. Nelson Essential of Pediatrics. 3th Ed. Chapter 13: 497-544 Philadelphia, Pennsylvania (1998)
59. Patterson K., Donnelly WH.: The Cardiovascular System. In: Stocker JT., Dehner LP. Pediatric Pathology. Volume 1; 2th Ed: 519-520; Philadelphia (2002)
60. Lee SH., Wolf PL., Escudero R., Deutsch R., Jamieson SW., Thistlethwaite PA.: Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. N Engl J Med; 342:626-33, (2000)
61. Burtis CA., Ashwood ER.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry; 5th Ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia (2001)
62. Harrison A., Morrison LK., Krishnaswamy P., et al.: B-Type Natriuretic Peptide Predicts Future Cardiac Events in Patients Presenting to the Emergency Department With Dyspnea. Ann Emerg Med; 39:131-38, (2002)
63. Ekekezie et al: Endostatin and Vascular Endothelial Cell Growth Factor(VEGF) in Piglet Lungs: Effect of Inhaled Nitric Oxide and Hyperoxia. Pediatr Res; Vol:53; 3:440-446 (2003)
64. Perkett EA, Klekamp JG: Vascular Endothelial Cell Growth Factor expression is decreased in rat lung following exposure to 24 or 48 hours of hyperoxia. Chest; 114:52-53 (1998)
65. Deveci D: Anjiyogenezis, arteriyogenezis ve vaskulogenezis terimlerinin anlamları ve hipoksik ve/veya iskemik koşullarda anjiyogenezis. Genel Tıp Derg; 13(3):141-151, (2003)

66. Malamitsi-Puchner A., Tziotis J., Protonotariou E., et al.: Heparin-binding angiogenic factors(basic fibroblast growth factor) in early neonatal life. *Pediatr Res*; 45-877-880, (1990)
67. Kunii Y., Kamada M., Ohtsuki S., et al.: Plasma brain natriuretic peptide and the evaluation of volume overload in infants and children with congenital heart disease. *Acta Med Okayama*; 57(4):191-197, (2003)
68. Himeno W: Angiogenic growth factors in patients with cyanotic congenital heart disease and in normal children. *Kurume Med J*; 48(2):111-116, (2001)
69. Corno AF., Milono G., Samaja M., Tozzi P., van Segesser LK.: Chronic hypoxia: A model for cyanotic congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 124:105-112, (2002)
70. Zucker S., Mirza H., Conner CE., et al.: Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer*; 75:780-786, (1998)
71. Lamoreaux WJ., Fitzgerald ME., Reiner A., Hasty KA., Charles ST.: Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res*; 55:29-42, (1998)
72. Ationu A., Carter N.: Brain and atrial natriuretic peptide plasma concentrations in normal healthy children. *Br J Biomed Sci*; 50(2):92-95, (1993)
73. Yoshibayashi M., Kamiya T., Saito Y., et al: Plasma brain natriuretic peptide concentrations in healthy children from birth to adolescence: marked and rapid increase after birth. *Eur J Endocrinol*; 133:207-209, (1995)
74. Koulouri S., Acherman RJ., Wong PC., Chan LS., Lewis AB.: Utility of B-Type natriuretic peptide in differentiating congestive heart failure from lung disease in pediatric patients with respiratory distress. *Pediatr Cardiol*; 25:341-346, (2004)
75. Nagaya N., Nishikimi T., Uematsu M., et al: Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*; 102:865-870, (2000)

76. Toth M., Vuorinen KH., Volteenaho O., et al.: Hypoxia stimulates release of ANP and BNP from perfused rat ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 266:H1572-H1580, (1994)
77. Talwar S., Squire IB., Downie PF., Davies JE.: Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and cardiotrophin 1 are raised in unstable angina. *Heart*; 84:421-424, (2000)
78. Hopkins WE., Chen Z., Fukagawa NK., et al.: Increased atrial and brain natriuretic peptides in adults with cyanotic congenital heart disease. *Circulation*; 109:2872-2877, (2004)
79. Gao Y., Wang JJ., Wang GF., Xu Q., Guo J.: Effect of hypoxia on production and secretion of matrix metalloproteinases in tumor cells. *Ai Zheng*; 24(2):180-183, (2005)
80. Shou M., Thirumurti V., Rajanayagam S et al.: Effect of basic fibroblast growth factor on myocardial angiogenesis in dogs with mature collateral vessels. *J Am Coll Cardiol*; 29:1102-1106, (1997)
81. Cherrington JM., Strawn LM., Shawver LK.: New paradigms for the treatment of cancer: The role of angiogenesis agents. *Adv Cancer Res*; 79:1-38, (2000)
82. Ribatti D.: The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis : a historical review. *British J Haematology*; 128:303-309, (2004)
83. Feucht M., Christ B., Wilting J.: VEGF induces cardiovascular malformation and embryonic lethality. *Am J Pathol*; 151(5):1407-1416, (1997)