T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALARINDA SERUM NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNİN KLİNİK VE PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ

Dr. Cezmi KARACA

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Zülal ÖZKURT

Uzmanlık Tezi
ERZURUM-2012

İÇİNDEKİLER

ONAY ..... **IV**
TEŞEKKÜR ..... **V**
ÖZET ..... **VI**
SUMMARY ..... **VIII**
KISALTMALAR ..... **XI**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **XIV**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **XV**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1 Tanım 2
2.2. Tarihçe 2
2.3. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) Virusu 2
2.3.1. Sınıflandırılması 2
2.3.2. Yapısı ve replikasyonu 3
2.3.3. Virusun türleri ve filogenetik ilişkiler 5
2.4. Ekoloji 5
2.4.1. Vertebralı Rezervuarlarda yaşam 5
2.4.2. Kene vektörler 5
2.4.3. İklim etkisi 7
2.5. Epidemiyoloji 8
2.6. Risk Grupları 10
2.7. Patogenez 11
2.8. Klinik Özellikler 13
2.8.1 İnkübasyon Dönemi 14
2.8.2. Prehemorajik dönemi 14
2.8.3. Hemorajik dönem 14
2.8.4. İyileşme dönemi (Konvelesan periyod) 17
2.9. Tanı 17
2.9.1. Non-spesifik Laboratuvar Testleri 17
2.9.2. Virüs İzolasyonu 17

2.9.3. İmmünolojik Yöntemler 18
2.9.4. Moleküler Yöntemler 18
2.10. Ayırıcı Tanı 19
2.11. Tedavi 19
2.12. Korunma ve Kontrol 21
2.13. Kötü Prognoz Kriterleri 36
3. NİTRİK OKSİT 23
3.1. Genel Özellikler 23
3.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 23
3.3. NO Sentezi 24
3.4. NO Sentaz (NOS) Enzimi 25
3.4.1. Yapısal (constitutive) izoformlar (cNOS) 25
3.4.2. İndükenebilen izoformlar (iNOS) 25
3.5. NO Metabolizması 28
3.6. NO'in İşlevleri ve Biyolojik Etkileri 28
3.6.1. Haberci modülatör olarak işlevleri 28
3.6.2. Fizyolojik etkileri 28
3.6.2.a. Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri 28
3.6.2.b. Santral ve periferik sinir sistemi etkileri 29
3.6.2.c. Diğer sistemler üzerine etkileri 29
3.6.3. İnflamasyonda NO'in rolü 30
3.6.4. NO'in immun sistem üzerine etkileri 31
3.6.5. Viral enfeksiyonlarda NO'in rolü 32
3.6.5.a. NO'in virus replikasyonundaki etkileri 32
3.6.5.b. Viral enfeksiyon süresince NO'in konak üzerine etkileri 33
3.6.6. Viral kanamalı ateşte NO'in rolü 34
4. GEREÇ VE YÖNTEM 36
4.1. Hasta Seçimi 36
4.2. Hasta Verileri 36
4.3. Çalışmanın Yöntemi 36
4.4. Nitrik Oksit (NO) Ölçümü 36
4.4.1. Nitrik oksit (NO) ölçümü için gerekli çözeltiler 37

4.4.2. NO değerlerinin saptanması....38
4.5. İstatistiksel Analiz....39
5. BULGULAR....40
5.1. Demografik ve Epidemiyolojik Bulgular....40
5.2. Semptomlar....41
5.3. Fizik Muayene Bulguları....42
5.4. Laboratuvar Bulguları....42
5.5. Serum NO Seviyeleri....43
5.5.a. Yaş, cinsiyet, sonuç (ölenler ve yaşayanlar), seyir (ağır, hafif-orta) ve semptomların başlamasından çalışma kanı alınmasına kadar geçen süre (1-3 gün, 4-7 gün)'ye göre serum NO düzeylerinin hastalar arasındaki karşılaştırılması....43
5.5.b. Hastaların bazı klinik özelliklerine göre serum NO seviyelerinin karşılaştırılması....44
5.5.c. Hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasında serum NO seviyelerinin karşılaştırılması....44
5.5.d. Hastaların eş zamanlı çalışılan laboratuvar bulgularının serum NO düzeyleri ile karşılaştırılması....46
6. TARTIŞMA....47
KAYNAKLAR....58
EKLER....70
Ek 1....70
Ek 2....71

ONAY

‘Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalarında serum NO düzeylerinin klinik ve prognoz ile ilişkisi’ isimli tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’nun 18.06.2009 tarih ve B.30.2.ATA.0.01/209 sayılı oturumunun 5 nolu kararı ile alınan onay doğrultusunda yürütüldü.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca hoşgörü, emek ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet PARLAK şahsında, Sayın Prof. Dr. Serpil EROL'a, Sayın Prof. Dr. Zülal ÖZKURT'a, Sayın Doç. Dr. Ayten KADANALI'ya, Sayın Yrd. Doç. Dr. Kemalettin ÖZDEN'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşe Albayrak'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine Parlak'a,

Tezimin hazırlanma sürecinde bilgi, deneyim, destek ve yardımlarını hiç esirgemeyen, yoğun emeğini her zaman şükranla hatırlayacağım tez hocam Sayın Prof. Dr. Zülal ÖZKURT'a,

Laboratuar çalışmalarımda yardımlarını eksik etmeyen AÜTF Biyokimya Anabilim Dalı öğretim görevlisi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a ve bilgi ve tecrübeleriyle desteğini hiç esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hülya Aksoy'a, çalışmamdaki katkılarından dolayı asistan arkadaşlarım Dr. Esra LALOĞLU ve Dr. Musa DÜDÜKCÜ'ye, biyokimya labratuvarının tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Servisimizde birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan anne ve babama,

Bende, yıllar sonra ihtisas yapma fikrinin yeniden oluşmasını sağlayan ve ihtisas eğitimim süresince her türlü desteği esirgemeyen ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan eşim Leyla KARACA'ya, bu süre zarfında bir şekilde fedakarlık yapmak durumunda kalan sevgili kızlarım Özge ve Bengüsu'ya en içten sevgilerimi sunarım.

Dr. Cezmi KARACA

ÖZET

Giriş: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu olmak üzere yaklaşık 30 ülkede tanımlanmış, ölümcül seyredebilen viral bir enfeksiyondur. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusu (KKKAV), Bunyaviridae ailesinin Nairovirus türüne dahildir ve insanlarda %3-30 arasında mortaliteyle seyreden ciddi tablolara yol açabilir. Nitrik oksit (NO) makrofaj, vasküler endotel hücreleri, kupffer hücreleri, adrenal ve serebral dokular gibi çeşitli hücreler tarafından üretilen, farklı hücre tipleri tarafından kullanılan önemli bir parakrin ve otokrin sinyaldir. NO'in vücutta, kan damarları dilatasyonundan, platelet agregasyonuna, infeksiyonla ve tümör hücreleri ile savaşa, inflamasyon mediatörlüğü ve makrofaj sitotoksik aktivitesine, sinir hücreleri arasında sinyal iletimine kadar geniş bir görev alanı vardır.

Amaç: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'nin patogenezi henüz yeterince açıklığa kavuşturulamamıştır. Çalışmamızın amacı KKKA patogenezinde NO rolünü araştırarak bunun klinik gidişle ve prognozla ilişkisini saptamak ve fizyopatolojik sürecin anlaşılmasına katkı sağlamaktır.

Gereç ve yöntemler: Çalışmaya Mart 2009 - Ağustos 2010 döneminde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniğinde yatarak takip edilen KKKA tanısı almış 60 hasta alındı. KKKA tanısı Anti-CCHF-IgM ve/veya PCR pozitifliği ile konuldu. Hastalar daha önce tanımlanmış ağırlık kriterlerine ve klinik ciddiyetine göre sınıflandırıldı. Hastaların hastaneye yatışları anında alınan serum örneklerinden NO çalışıldı. Çalışmada NO konsantrasyonu tayini için onun stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrat ölçümleri kullanıldı. Her hastanın serum numuneleri hazırlanan Griess reaktifi ile muamele edildi. Oluşan bileşiğin renk şiddeti spektrofotometrede ölçüldü. Her bir numune için ELISA mikroplate reader'den elde edilen değerler katsayılarla hesaplanarak NO değerleri tespit edildi. Bu metodun tespit edebildiği en düşük NO konsantrasyonu (saptama limiti) 1,5 µmol/l idi.

Bulgular: Ağırlık kriterlerine göre hastaların 18'i (% 30) ağır, 42'si (% 70) hafif-orta gruba dahildi. Çalışmaya alınan toplam 60 hastanın 6 tanesi (% 10) öldü, 54 (% 90) hasta şifa ile taburcu edildi. Hastalarla kontrol grubunun serum NO düzeylerinin karşılaştırılmasında ise, ortalama NO düzeyleri hasta grubunda 19,56 ± 15,73 µmol/L, kontrol grubunda 29,9 ± 16,573 µmol/L olup kontrol grubunda hastalardan anlamlı oranda yüksekti (p=0,006). Ölen ve sağ kalan hastaların serum NO düzeyleri kendi

aralarında karşılaştırıldığında; ortalama NO değeri ölen hasta grubunda 20,2±20,6 µmol/L, sağ kalan hasta grubunda 19,5±15,3 µmol/L olup fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,791). Ortalama NO değeri kontrol grubunda 29,9±16,5 µmol/L ile hem ölen hem de sağ kalan hasta grubundan yüksek bulundu. Ancak aradaki fark, ölen hasta grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamsızdı (p=0,126); bununla beraber sağ kalan hasta grubunda, kontrol grubuna göre NO değerleri anlamlı ölçüde düşüktü (p=0,007). Hastalığın seyrine göre, hafif-orta grupta serum NO düzeyi 19,3±15 µmol/L iken ağır hastalarda serum NO düzeyi ise 20,3±17,95 µ/mol/l olup fark istatistiksel olarak anlamsızdı (p=0,993). Kontrol grubun serum NO değeri ise 29,9±16,52 µ/mol/L ile bu her iki gruptan anlamlı derecede yüksekti (hafif-orta grup için p=0,009 ve ağır hasta grubu için p=0,047). Hastaların çalışma kanıyla eş zamanlı alınıp çalışılan kandaki bazı laboratuar parametrelerine ait değerler ve klinik bulgulara göre serum NO düzeylerinin karşılaştırılması yapıldı ve sadece LDH seviyeleri ile NO değerleri arasında anlamlı korelasyon saptandı.

Sonuç: KKKA'da NO sentezi azalabilmektedir. Bu azalma Th1 ve Th2 immun cevapla etkileşimi sonucu veya direkt viral etki ile olabilir. KKKA'da NO seviyelerinin kontrol grubuna göre düşük bulunması gerekli Th1 immün cevabının oluşması için NO seviyelerinin azaltılmış olabileceğini düşündürmektedir. Fatal olgular ile kontrol grubunun NO değerleri arasında fark yokken sağ kalanlarla farklı olması da düşük düzeyde NO seviyelerinin daha iyi bir immün yanıtı sağladığının kanıtıdır. Her ne kadar çalışmamızda NO düzeylerinin sağ ve ölen hastalarda anlamlı düzeyde farka ulaşmaması prognostik bir değeri olmadığı izlenimini verse de; kontrol grubu ile sağ kalan olgular arasındaki belirgin fark aslında NO'in hastalıkta immünregülatuar bir rol oynadığını açıkça göstermektedir.

NO'in KKKA patogenezindeki rolünün ve prognostik değerinin daha iyi anlaşılması için tüm immünolojik parametrelerin, viral yükün ve NO değerlerinin eş zamanlı olarak çalışıldığı ve bu parametrelerin hastalığın dönemlerine göre değişimini kinetik olarak incelendiği daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi, nitrik oksit, immünpatogenez, viral kanamalı ateş

SUMMARY

Background: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) is a viral infection defined in 30 countries in Africa, Asia, East Europe and Mittle East which may be fatal. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) belongs to the Nairovirus species of Bunyaviridae family and cause serious conditions progressing to 3–30% mortality in humans. Nitric oxide (NO) is an important paracrine and autocrine signal, which is used by different cell types and produced by several cells such as macrophage, vascular endothelium cells, Kuppfer's cells, and adrenal and cerebral tissues. NO has many roles, ranging from blood vessel dilation, to platelet aggregation, fighting against infection and tumor cells, mediating inflammation and macrophage cytotoxic activity, and signal transduction between nerve cells.

Objective: The pathogenesis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever is still not well understood. The aim of our study is to analyze the role of NO in CCHF pathogenesis and to define its relation with clinical progression and prognosis and to help in understanding the physiopathological process.

Material and methods: Sixty patients diagnosed with CCHF which were followed in the Infectious Diseases and Clinical Microbiology Department of Atatürk University Medical Faculty between March 2009 and August 2010 as inpatients were included in the study. CCHF diagnosis was made with Anti-CCHF-IgM and/or PCR positive results. Patients were classified according to their previously defined severity criteria and clinical severity. Serum samples of patients taken at the time of their hospitalization were analysed for NO. For determining the NO concentration, nitrite and nitrate, which are its stable end products, were used in the study. Serum samples of each patient were treated with Griess reagent. The color strength of the compound formed was measured with a spectrophotometer. NO values were determined for each sample by calculating the values obtained from an ELISA microplate reader with coefficients. The lowest NO concentration that can be detected with this method (detection limit) was 1.5 µmol/l.

Results: Eighteen patients (30%) belonged to the severe group, whereas 42 patients (70%) belonged to the mild-moderate group, according to the severity criteria.

Among 60 patients included in the study, 6 (10%) patients died and 54 patients (90%) were discharged from the hospital as recovered. When the serum NO levels of patient and control groups were compared, the NO levels were 19.56 ± 15.73 µmol/L for the patient group and 29.9 ± 16.573 µmol/L for the control group, thus significantly higher in the control group compared to the patient group (p=0.006). When the serum NO levels of deceased and surviving patients were compared, the average NO level was 20.2±20.6 µmol/L for the deceased patient group whereas it was 19.5±15.3 µmol/L for surviving patient group, which is statistically not significant (p=0.791). Moreover, deceased and surviving patient groups were separately compared to the healthy control group in terms of NO values. The average NO level of the control group was higher than both deceased and surviving patient groups, with a value of 29.9±16.5 µmol/L. However, this difference was statistically not significant when compared with deceased patient group (p=0.126). At the same time the NO levels were significantly lower in the surviving patient group compared to the control group (p=0,007). The serum NO level was 19.3±15 µmol/L for the mild-moderate group and 20.3±17.95 µ/mol/l for the severe patients in terms of progression of the disease, which was statistically not significant (p=0.993). The serum NO level of the control group was significantly higher than both groups (p= 0.009 for the mild-moderate group and p=0.047 for the severe patient group) at 29.9±16.52 µ/mol/L. Serum NO levels were compared according to the clinical outcomes and values of some laboratory parameters in blood simultaneously taken with the working blood sample of patients, and significant correlation was found between in only LDH and NO value.

Conclusion: NO synthesis may decrease during KKKA. NO might have been reduced due to its interaction with Th1 and Th2 immune response or directly by viral effect. The fact that NO levels were lower in CCHF groups compared to the control group gives rise to the thought that NO levels were reduced to form the required Th1 immune response. Another fact improving the way in which low NO levels provide a better immune response is the non-presence of a difference between fatal cases and the control group and the presence of a difference in the surviving group. Although the lack of a significant difference in NO levels between surviving and deceased patients gives the impression that NO has no prognostic value, in fact the clear difference between the

control group and the surviving group clearly shows that NO plays an immunoregulatory role in the disease.

We believe that further studies kinetically researching all immunological parameters, the changes in viral load and NO levels together and according to the stage of the disease are necessary to understand the role of NO in CCHF pathogenesis and its prognostic value better.

Key words: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, nitric oxide, immunpathogenesis, viral hemorrhagic fever

KISALTMALAR

VKA	: Viral kanamalı ateş
KKKAV	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusu
KKKA	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
NP	: Nükleokapsit proteinini
HAİ	: Hemaglutinasyon İnhibisyon
RES	: Retiküloendoteliyal sistem
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
DİK	: Dissemine intravasküler koagulopati
MODS	: Multiorgan yetmezlik sendromu
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
ICAM-1	: Intercelular adhesion molecule-1
VCAM-1	: Vascular cell adesion molecule
PAI	: Plazminojen aktivatör-inhibitör
IL	: İnterlökin
LPS	: Lipopolisakkarit
IFN	: İnterferon
AST	: Asparat aminotransferaz
ALT	: Alanin aminotransferaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
CPK	: Kreatin fosfokinaz
PT	: Protrombin zamanı
aPTT	: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
INR	: İnternational normalization ratio
IFA	: İmmünofloresan Antikor
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
RT-PZR	: Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ITP	: İdiyopatik trombositopenik purpura
HÜS	: Hemolitik üremik semdrom

TDP : Taze donmuş plazma
WBC : Lökosit
PLT : Trombosit
NO : Nitrik Oksit
NOS : Nitrik Oksit Sentetaz
eNOS (NOS3) : Endotelial Nitrik Oksit Sentetaz
nNOS (NOS1) : Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz
iNOS (NOS2) : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
NADPH : Nikotin adenin dinükleotiti fosfat
FMN : Flavin adenin mononükleotid
FAD : Flavin adenin dinükleotid
BH4 : Tetrahidrobiopterin
TGF-β : Transfoming büyüme faktör-β
MDF : Makrofaj farklılaştırıcı faktör
NO_3 : Nitrat
NO_2 : Nitrit
GAPDH : Glukoz-6-posfat dehidrogenaz
cGMP : Siklik guanozin monofosfat
L-NMMA : N-Monomethyl-L-Arginine
VIP : Vazoaktif intestinal peptit
GCSF : Granülosit koloni stimülan faktör
NF-κB : Nükleer Faktör-κB
DV : Dengue virus
DF : Dengue Fever (Deng ateşi)
DSS : Deng Septik Şok
DHF : Dengue hemorajik fever (Deng kanamalı ateşi)
HTNV : Hantavirus
SPSS : Statistical Package for the Social Sciences
HIV : Human immündeficiency virus
APC : Antijen sunan hücre
Treg : Regülatör T hücreleri
NO-Treg : Nitrik oksit bağımlı Regülatör T hücreleri

VP1	: Viral kapsid proteini 1
CSFV	: Klasik swine fever virus
PG	: Prostaglandin
MDV	: Marek's hastalık virusu
STAT-1	: Signal Transducers and Activators of Transcription
IRF-1	: Interferon regulatory factor 1
ADE	: Antibody-dependent enhancement
RANTES	: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
MCP-3	: Human monocyte chemotactic protein-3

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo1. Ülkemizde 2002-2010 yılları arasında görülen toplam KKKA vaka sayısı ve ölümler 3
Tablo 2. KKKA ile ilişkili başlıca kene türleri ve görüldüğü ülkeler ve bölgeler özetlenmiştir 6
Tablo 3. Ülkemizde 2011 yılına kadar izlenen KKKA hastalarının başlıca semptomları 16
Tablo 4. NOS' ların özellik ve farklılıkları 27
Tablo 5. Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet durumları 40
Tablo 6. KKKA hastalarının demografik özellikleri 41
Tablo 7. KKKA tanısı ile takip edilen hastaların semptomları 41
Tablo 8. KKKA olgularının fizik muyene bulguları 42
Tablo 9. Fatal ve nonfatal seyreden hastalara ait çeşitli laboratuvar bulguları 43
Tablo 10. Hastaların cinsiyet, klinik seyir ve çalışma gününe göre NO değerlerinin karşılaştırılması 44
Tablo 11. Hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki NO değerlerinin karşılaştırılması 44
Tablo 12. Ölen ve sağ kalan hastaların serum NO seviyeleri ile kontrol grubu NO değerlerinin ile karşılaştırılması 45
Tablo 13. Klinik şiddete göre hasta gruplarının ve kontrol grubunun NO değerlerinin karşılaştırılması 46
Tablo 14. Hastaların eş zamanlı çalışılan laboratuar bulgularının serum NO düzeyleri ile korelasyonu 46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. KKKAV'nun şematik yapısı....4
Şekil 2. *Hyalomma marginatum marginatum* kenelerinin Türkiye üzerindeki dağılımı....6
Şekil 3. *Hyalomma marginatum marginatumun* yaşam döngüsü....7
Şekil 4. Ülkemizde 2002-2009 KKKA olgularının dağılımı....9
Şekil 5. Ülkemizde KKKA vakalarının illere göre yoğunluğu....9
Şekil 6. KKKA virusu ile infekte edilmiş farelerin postenfeksiyöz 3. günde çeşitli organlardaki histopatolojik değişikliklerin hemotoksilen eozin boyası ile boyanmış mikroskobik görünümleri....12
Şekil 7. KKKA'inde patogenezin şematik gösterimi....13
Şekil 8. KKKA'nin klinik ve laboratuar seyri (DIC: Dissemine intravasküler koagülopati)....16
Şekil 9. NO'in biyolojik reaksiyonları....24
Şekil 10. NO sentezi....25
Şekil 11. NO salınımı ve bazı etkilerinin şematik gösterimi....30
Şekil 12. Viral enfeksiyonlar sırasında NO oluşum mekanizması....32
Şekil 13. NO'in viruslar üzerine etkileri....34
Şekil 14. Ölen, şifa ile taburcu edilen ve kontrol grubu hastaların serum NO seviyeleri....45

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), son yıllarda ülkemizde görülen, kanamalarla seyreden, ölümcül olabilen, akut, ateşli, viral bir hastalıktır. Etken, Bunyaviridae ailesinin Nairovirus türündendir. Bunyaviruslar, zarflı ve negatif polaritesi olan tek iplikçikli RNA virüsleridir. Taşıyıcı vektör Hyalomma genusundan keneler, özellikle de *H. marginatum marginatum* keneleridir. Hastalık ülkemizde her yıl ilkbahar-yaz döneminde baş göstermekte mevsim boyunca önemli bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Dünyada vaka sayısının en fazla olduğu yer ülkemizdir. Hastalıkta naturel killer (NK) hücre aktivasyonu, makrofaj aktivasyonu ve hemofagositoz olası patolojik süreçlerdir. Ayrıca muhtemelen vasküler endotel hasarı nedeniyle başlayan koagülopati kanamalara yol açmaktadır. Kanama ise hastalıktan kaynaklanan ölümlerin en sık sebebidir. Hastalığın immün patolojisi ve kanamaya yol açan süreçte nasıl bir mekanizmanın söz konusu olduğu henüz bilinmemektedir. Hastalığın bilinen bir aşısı ya da etkin bir tedavisi henüz olmayıp, tedaviler daha çok genel destek tedavisinden ibarettir. KKKA'nde immünoloji, fizyopataolojik özellikler, virus kinetiği ve tedavisi ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır. Çünkü zaman zaman ölümcül olabilen bu hastalığın günümüzde hayat kurtarıcı bir tedavisi veya aşısı henüz bulunmamaktadır. Aşı ve immün serum geliştirme konusunda ülkemizde çalışmalar devam etmektedir.

Nitrik oksid (NO) bilindiği gibi hem infeksiyonlarda makrofajların mikroorganizmaları öldürme etkisinde aracılık etmekte, hem de damar endotelinde damar tonusunun sağlanmasında ve trombosit aktivasyonunun önlenmesinde rol oynamaktadır. Bütün bu etkiler sepsis ve viral hemorajik ateşler gibi vaskülitle seyreden infeksiyonların immünpatolojisinde NO'in önemli rolü olduğunu göstermektedir. KKKA'nde Nitrik oksid (NO) düzeylerini araştıran sadece bir çalışma yapılmıştır.

Çalışmamızın amacı bu süreçlerde önemli olabilecek hematolojik ve immünolojik parametrelerden biri olan Nitrik Oksit düzeylerini araştırarak klinik gidişle ve prognozla ilişkisini saptamak ve fizyopatolojik sürecin anlaşılmasına katkı sağlamaktır. Böylece henüz etkin bir tedavisi olmayan hastalıkta hem daha sonra yapılacak çalışmalara yön verme konusunda faydalı olunacağı, hem de eksik maddelerin yerine konması gibi tedavilerin gelişimine katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Viral kanamalı ateş (VKA) birçok virus ile ilişkili, ateş ve kanama ile seyreden akut sistemik tutulumlu hastalıkları tanımlayan bir terimdir (1). VKA etkenleri Arenaviridae (Lassa virus, Junin, Machupo, Sabia, Guanarito virusları), Bunyaviridae (Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusu (KKKAV), Rift Vadisi ateşi virusu ve Hanta virus), Filoviridae (Marburg, Ebola virusu), ve Flaviviridae (Yellow fever virusu ve Deng virusu)'dir. Bunlar arasında insandan insana geçebilme özelliği de olanlar Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi virusu (KKKAV), Lassa, Marburg ve Ebola etkenleridir. Salgınlar yapabilme potansiyeline sahip bu dört etken aynı zamanda hastane ve laboratuar çalışanları arasında da yayılabilir (1, 2).

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu olmak üzere yaklaşık 30 ülkede tanımlanmış ölümcül seyredebilen viral bir enfeksiyondur (3, 4, 5). Virusu, Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virusu (KKKAV), Bunyaviridae ailesinin Nairovirus türüne dahildir ve insanlarda %3-30 arasında mortaliteyle seyreden ciddi tablolara yol açar (6, 7).

KKKA olguları Türkiye'de ilk kez 2002 yılında rapor edilmiştir (8, 9,10). 2002 - 2010 yılları arasında Sağlık Bakanlığına 5317 olgu rapor edilmiş ve bu hastaların 267 tanesi kaybedilmiştir (Tablo 1) (11).

2.2. Tarihçe

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşinin modern tıp biliminin gündemine girmesi 1944-45 yıllarında Kırım'da savaş sırasındaki salgında hastalanan 200 Sovyet ordu personelinde tanımlanmasıyla başlamıştır (3, 5). Hastalığın Keneler ile ilişkisi tespit edilmiş ve hastalığa Kırım Kanamalı Ateşi adı verilmiştir. Daha sonra etken virüs, hastalık tablosundaki insanlar ile Hyalomma marginatum marginatum larvalarında ve erişkin kenelerinde izole edilmiştir (5). Kongo virus ise 1956 yılında Kongo'da izole edilmiş ve daha sonra bu virus ile Kırım Kanamalı Ateşi virusunun aynı viruslar oldukları anlaşılarak bugünkü adı verilmiştir (12).

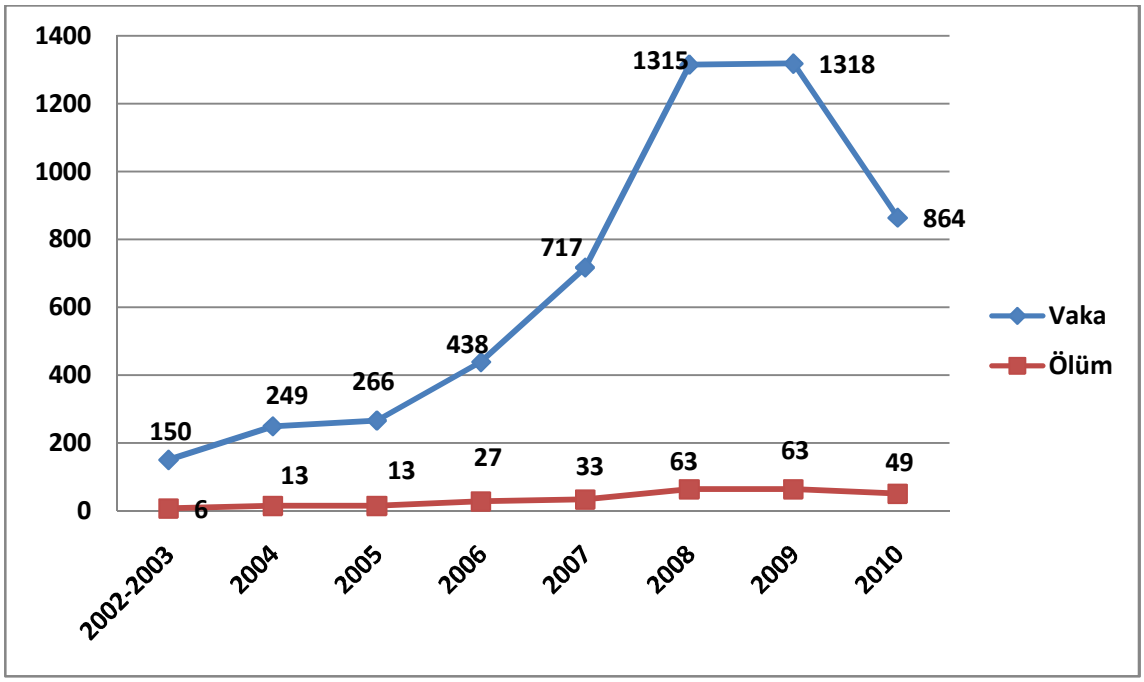
2.3. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) Virusu

2.3.1. Sınıflandırılması

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi virusu (KKKAV), Bunyaviridae ailesinden Nairovirus cinsinin bir üyesidir. Aile içindeki diğer cinsleri Orthobunyavirus, Hantavirus, Phlebovirus ve

Tosbovirusdur. Uluslararası Virus Taksonomi Komitesinin raporlarına göre, Bunyaviridae ailesi 34 viral ırkı barındırmaktadır ve KKKA virusu Nairovirus cinsi içindeki 7 türden birisidir (5).

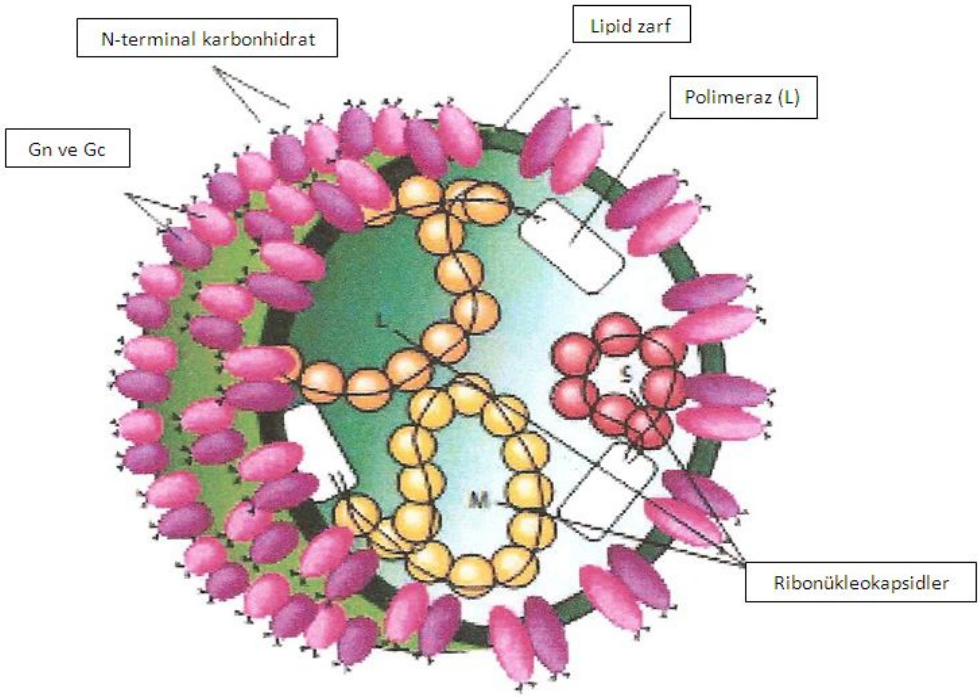
Tablo1. Ülkemizde 2002-2010 yılları arasında görülen toplam KKKA vaka sayısı ve ölümler (11)



2.3.2. Yapısı ve replikasyonu

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi virusunun moleküler yapısı (Şekil 1) (5) ve temel özellikleri (morfogenez, üreme siklusu ve fizikokimyasal özellikleri), Bunyaviridae ailesine benzer (13).

Nairoviruslar dayanıksızdır ve konakçı dışında yaşayamazlar. Bu viruslar 56°C'de 30 dakikada inaktive olurken, kanda 40°C'de 10 gün yaşayabilirler. Virus %1 hipoklorit, %2 gluteraldehite duyarlıdır ve ultraviyole ışınları ile hızla inaktive olur (14).



Şekil 1. KKKAV'nun şematik yapısı

Virionlar yaklaşık 100 nanometre çapında, küreseldir. Zarf lipid yapıdadır. Zarf üzerinde glikoprotein çıkıntılar vardır (Şekil 1) (5). KKKAV genomu, Bunyaviridae ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi üç negatif polariteli L, M ve S RNA segmentinden oluşmaktadır.

- L (Large) Segment: Viral RNA bağımlı RNA polimerazı kodlar.
- M (Medium) Segment: İki önemli glikoproteini (Gc ve Gn) kodlar. Bunlar virus zarfında çıkıntı şeklinde yapılardır ve konak hücreye tutunma ve hücre içine girişi sağlar.
- S (Small) Segment: Yapısal protein olan nükleokapsit proteinini (NP) kodlar. Bu protein RNA segmentleri ile kompleks yaparak RNA'yı korur. Virus polimerazı ile birlikte replikasyon ve viral transkripsiyonda da görev alır.

S, M ve L ribonükleokapsidlerinin her biri infektivite için bir virionda bulunmalıdır (15). Glikoproteinlerin, hedef hücrelerin reseptör bölgelerinin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Reseptörlere yapışan viruslar, endositoz ile içeri alınırlar ve replikasyon stoplazmada meydana gelir. Virionlar endoplazmik retikulum üzerinden golgi bölgesinde stoplazma içi veziküllere tomurcuklanırlar ve bunlar virusu salmak için stoplazma membranı ile birleşirler (5).

2.3.3. Virusun türleri ve filogenetik ilişkiler

Nükleik asit sekans analizine dayanan çalışmalarda KKKAV'nun genetik farklılıkları ortaya konulmuştur. M segmet analizlerine göre 8, L segment analizlerine göre 6 ve S segment analizlerine göre 6 türü olduğu gösterilmiştir. Türkiye'de son dönemlerde izole edilen virus türleri, Güneydoğu Rusya'daki ve Kosova'daki KKKA virusu türüne çok benzemektedir (5).

2.4. Ekoloji

2.4.1. Vertebralı rezervuarlarda yaşam

Diğer kene ile bulaşan ajanlar gibi, KKKA virusu genellikle, kene-vertebralı-kene döngüsünde yaşamaktadır. Virusun hayvanlarda klinik olarak hastalığa neden olduğuna dair bulgu yoktur. KKKA virusu sığır, keçi, koyun, tavşan, kirpi, fare, domuz gibi pek çok evcil ve vahşi hayvanlardan izole edilmiştir (5). Kuşlarda viremi ve/veya antikor cevabı olmaz ve bu nedenle kuşlar KKKA virusu enfeksiyonuna dirençlidir (5).

2.4.2. Kene vektörler

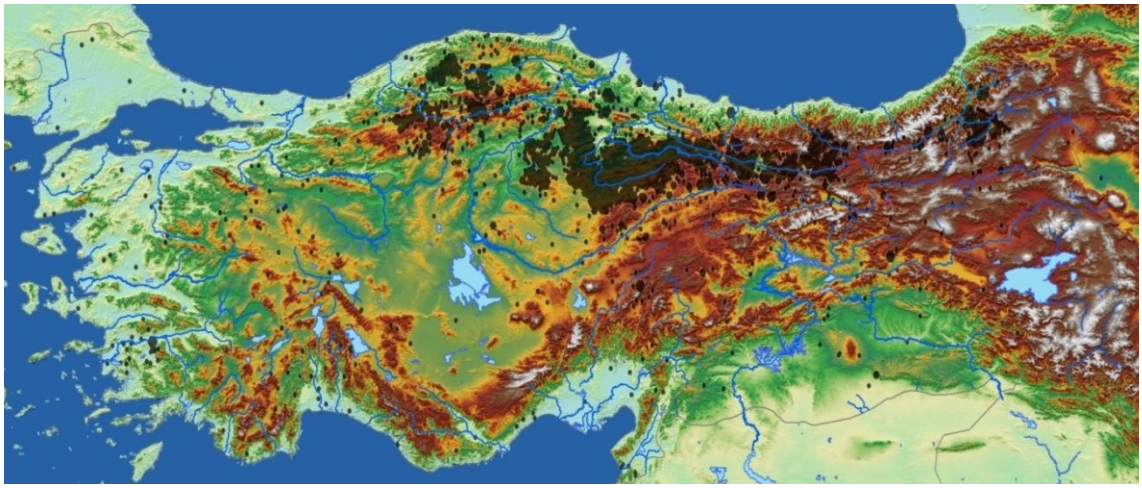
Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi zoonotik bir enfeksiyondur ve virusun başlıca vektörü Hyalomma cinsi kenelerdir. Bugün tespit edilen kene türü sayısı yaklaşık 850'dir. Özellikle *Hyalomma marginatum marginatum* başta olmak üzere bu kenelerin vahşi hayvanlarda olduğu kadar evcil hayvanlarda da olabildiği bilinmektedir.

KKKA virusu 1960'ta yetişkin bir keneden izole edilmiştir (4). Keneler virusu ömür boyu (1-1,5 yıl), evcil ve yabani hayvanlar ise 7-10 gün kadar barındırabilir (4). Ayrıca virusun kenelerde transovarial (enfekte anneden yumurtaya) ve transtadial (larvadan nimfaya ve erişkin hale) geçişi gösterilmiştir (5).

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi virusu, özellikle *Hyalomma marginatum marginatum* başta olmak üzere*, Hyalomma truncatum, Hyalomma marginatum rufipes, Hyalomma impeltatum, Hyalomma impessum, Amblyomma variegatum* ve *Boophilus decolaratus* türü de olmak üzere en az 31 kene türünden ve bir tür tatarcıktan izole edilmiştir (3, 5). Hyalomma cinsi keneler KKKA virusu için ekoloji ve epidemiyolojisinde en önemli kenelerdir (3).

Tablo 2. KKKA ile ilişkili başlıca kene türleri ve görüldüğü ülkeler ve bölgeler özetlenmiştir (16)

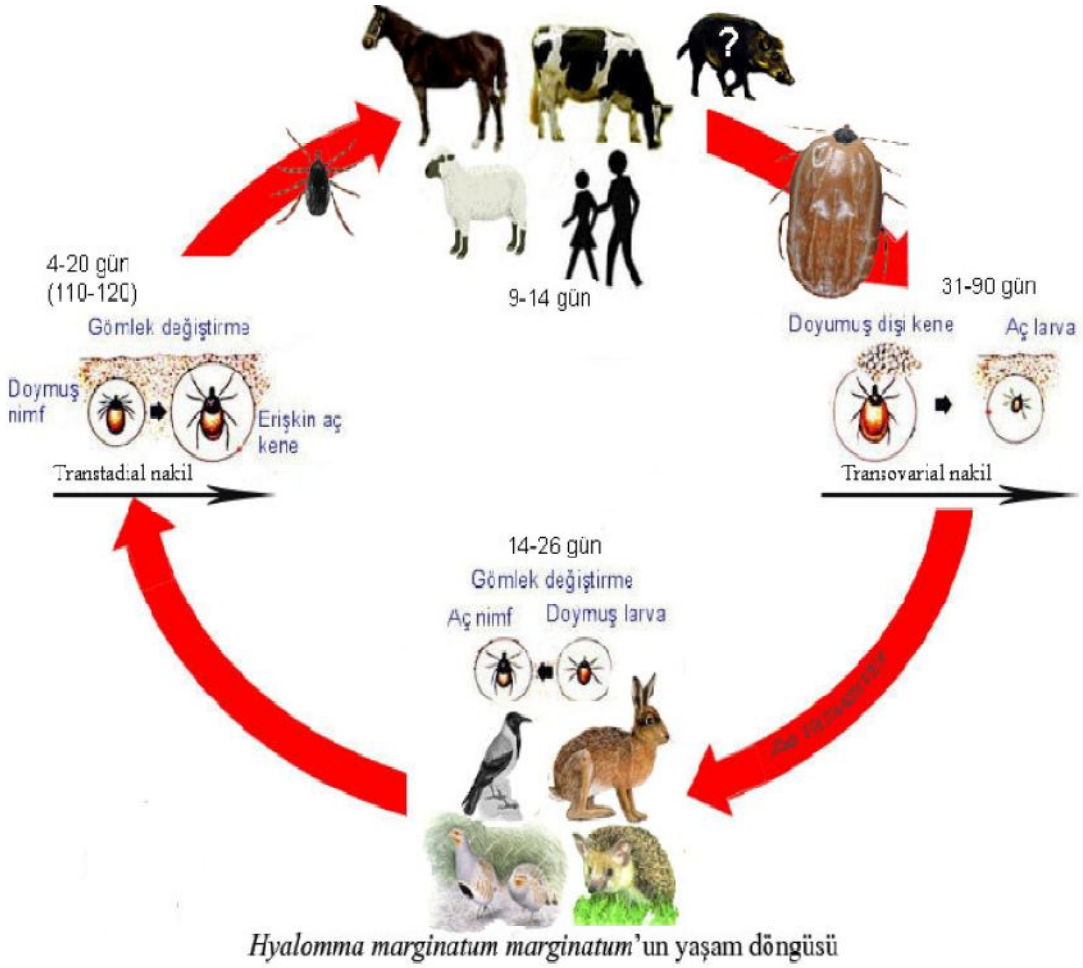
Bölge -Ülke	Kene Türleri
Batı ve Güney Africa	*Hyalomma marginatum rufipies ve hyalomma turanicum*
Madagaskar	*Boophilus microplus*
Çin	*Hyalomma asiaticum asiaticum*
Özbekistan	*Hyalomma asiaticum asiaticum*
Tacikistan	*Dermacentor niveus*
Pakistan	*Hyalomma anatolicum*
Rusya ve Balkanlar	*Hyalomma marginatum marginatum*
TÜRKİYE	***HYALOMMA MARGİNATUM MARGİNATUM VE RHİPİCEPHALUS BURSA***
Yunanistan	*Rhipicephalus bursa*



Şekil 2. *Hyalomma marginatum marginatum* kenelerinin Türkiye üzerindeki dağılımı (11)

Her ne kadar KKKA virusu epidemiyolojisinde Hyalomma cinsi en önemli vektör olarak düşünülse de diğer cinslerden de virus izole edilmiştir. Bu durum hastalığın geniş coğrafik yayılımı açıklayabilir. Kenelerin biyolojik rolü, sadece virus vektörü olarak değil, aynı zamanda doğada virus rezervuarı olarak da önemlidir. Henüz beslenmemiş kenelerden de virus tespit edilmiştir olup bu bulgu virusun enfekte annelerinden yumurtalara geçişini desteklemektedir. Virus olgunlaşmamış kenelerden daha sonraki hayat evrelerine direk geçebilir ve bu deneysel olarak gösterilmiştir. Aynı zamanda *Hyalomma trancatum* kenesinin erkeğinden dişisine cinsel yolla bulaştığı da tespit edilmiştir. KKKA virusu, kenelere deneysel şartlarda intraanal yoldan inoküle edildikten 36 saat sonra replike olmaya başlamış ve 3-5 gün sonunda maksimum virus seviyesine ulaştıktan sonra azalarak aylarca tespit edilebilmiştir (5).

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşinin Avrupa, Asya ve Afrika'daki dağılımı, global Hyalomma kenelerinin dağılımına uymaktadır (3, 5). *H. marginatum marginatum* Akdeniz Hyalomması olarak da bilinir ve muhtemelen Avrupa'daki asıl KKKA virusu vektörüdür. KKKA virusu aynı zamanda *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve diğer Hyalomma türlerinden de izole edilmiştir (3, 5). Kenelerden viral izolasyon tek başına vektör olarak suçlanmalarına yetmeyebilir ve bunun için ek laboratuar ve epidemiyolojik çalışmalar gerekmektedir (5). Kenelerin yaşam döngüsü Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 3. *Hyalomma marginatum marginatumun* yaşam döngüsü (17)

2.4.3. İklim etkisi

İklimdeki değişimin, kene popülasyonunda üremeyi kolaylaştırdığı ve hastalığı artırdığı düşünülmektedir (18). Kuzey yarımkürede, ısının baharda artması ile H. marginatum aktive olmaktadır. Ukrayna'da 1963-64'lerde yapılan bir çalışmada bu gösterilmiştir. Havaların çok soğuk olduğu dönemlerde ise tersi durum söz konusudur. Astrakhan Oblast'da 1968-69'daki sert kışla beraber populasyonda azalma görülmüştür. Bunun sonucunda KKKA vakalarının sayısı hızlıca düşmüştür (3).

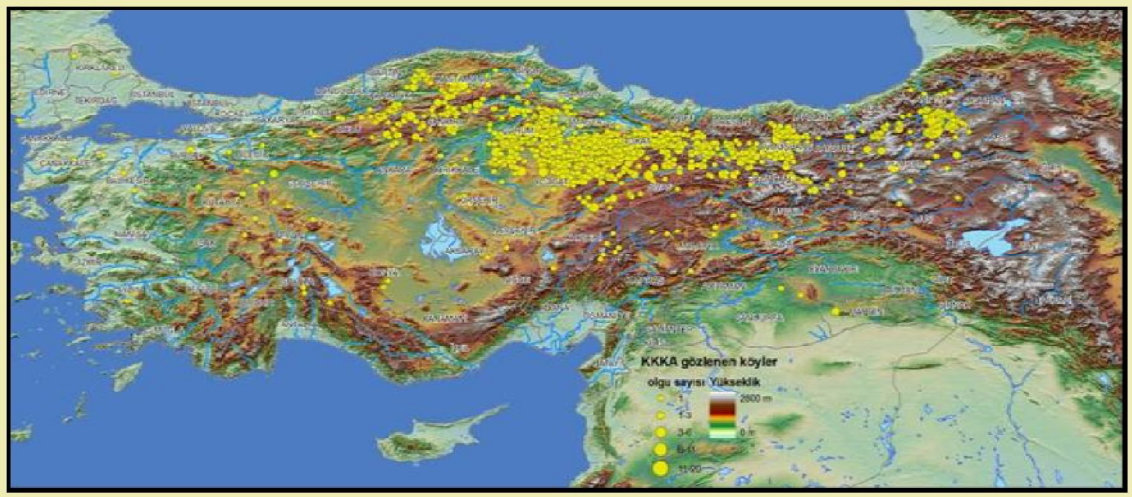
Genel olarak KKKA salgınlarında, eş zamanlı Hyalomma spp. kenelerinin çoğalması ve immatür ya da erişkin formlarının hayatta kalması için uygun iklim faktörleri ve çevresel değişimin gerekli olduğu görülmüştür. Sovyetler Birliğinde, II. Dünya savaşı boyunca Kırım'da işgalden sonra (1941-44) normal ziraat aktiviteleri bozulmuş ve yaban hayatı artmıştır. Savaş zamanı kullanılmayan ziraat alanlarının yeniden tarıma açılması ile duyarlı askeri personelin ya da göçmenlerin enfekte ziraat alanına girişi, çevresel değişikliklere neden olmuştur ve modern çağın ilk salgını belgelenmiştir. İlginç olarak Türkiye'deki ilk salgın da benzer olarak açıklanabilir. Etkilenen bölgelerde çeşitli nedenlerle 1995-2001 yılları arasında yaban hayatının arttığı tespit edilmiştir. 2001'den sonra tarlalar tarım ve avcılık için uygun hale gelince keçi ve koyunlar virus taşıyan kenelere maruz kalmış olabilirler (3). Göçmen kuşların ve evcil hayvanların uzak coğrafyalara virusun yayılımındaki potansiyel rolü araştırılmıştır (3). Balkanlardan göçen kuşların Türkiye'de 2002 yılındaki salgına sebep olduğu düşünülmektedir (9). Fakat KKKAV'nun, kuşlar veya kuş paraziti kenelerce taşındığına dair kesin veri yoktur.

Hastalık mevsimsel özellik göstermektedir. Eski Sovyetler Birliği'nde Haziran ve Temmuz aylarında olgu sayısı açısından en yüksek sayıya ulaşılmaktadır. Güney Afrika Cumhuriyeti'nde olguların çoğu ilkbahar ve sonbaharda ortaya çıkmaktadır. Genel olarak hastalığın Haziran-Eylül ayları arasında ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bununla birlikte bölgeye göre değişmekte ve Ocak ayında da görülebilmektedir (19). Ülkemizde hastalık genellikle Nisan-Eylül aylarında ortaya çıkmaktadır.

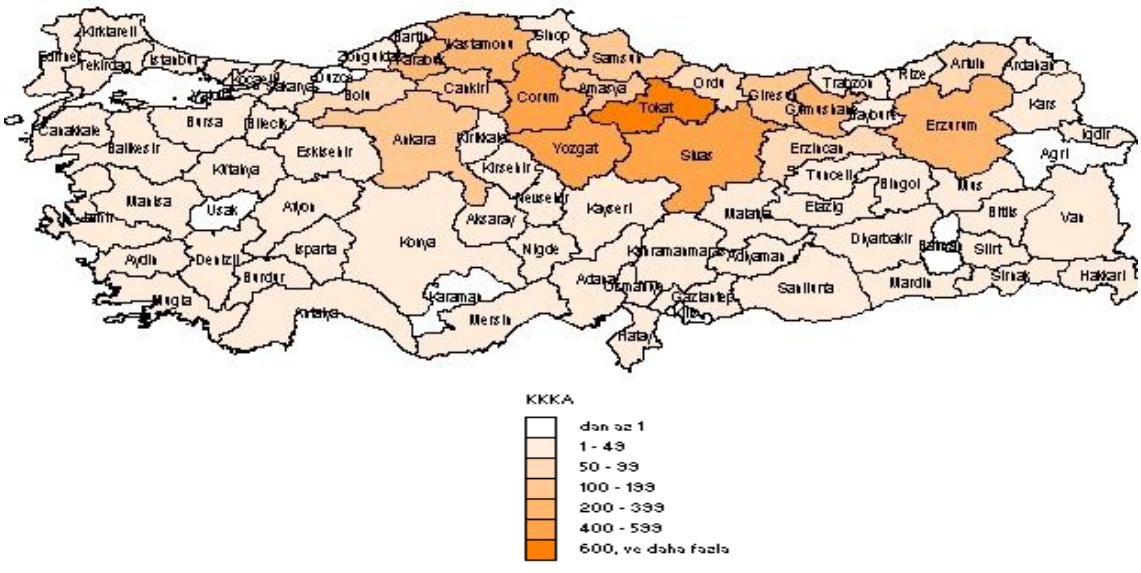
2.5. Epidemiyoloji

KKKA virüsunun diğer kenelerle bulaşan viruslar gibi çok büyük coğrafi alana yayılımı vardır ve Afrika, Asya, Güney Avrupa ve Orta Asya'dan viral izolasyon ve/veya hastalık raporları mevcuttur (3). Fransa, Portekiz, Yunanistan ve Hindistan'da varlığına dair sadece sınırlı serolojik araştırmalara dayanmaktadır. İlginç bir şekilde, KKKA Türkiye'de ilk defa 1980 yılında Ege bölgesinde Demir Serter ve ekibinin yaptığı bir çalışmada Hemaglutinasyon İnhibisyon (HAİ) testi ile araştırılmış; % 9.1 oranında pozitiflik saptanarak sadece serolojik olarak varlığı gösterilmiştir. 2003 yılında ise kesin olarak vakalar tanımlanmış ve 2001 yılından itibaren benzer vakalar olduğu ifade edilmiştir (3). Daha sonra, iki hastadan virus izolasyonu yapılmıştır. M segmentinin filogenetik analizine göre, Türkiye'de KKKA virusunun iki farklı genetik soyunun bulunduğu gösterilmiştir. Bunlar Kosova ve Güneydoğu Rusya'da bulunan virus soylarına benzemektedir. Bu suşlar 2002 yılında İran'da meydana gelen KKKA virusu salgınından (20) izole edilen suşlardan farklıdır.

Bundan dolayı bu virusların Türkiye'de bölgesel olduğu, İran'dan gelen enfekte kene veya çiftlik hayvanı ithalatından kaynaklanmadığı düşünülmüştür. Fakat 2007'de Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi virusunun S segment sekansları analizine göre yapılan filogenetik sınıflamada Drostov suşu beşinci takımın birinci koluna yerleşirken ikinci koluna Kosova, İran ve Türkiye'deki suşlar yerleştirilmiştir (21).



Şekil 4. Ülkemizde 2002-2009 KKKA olgularının dağılımı (11)



Şekil 5. Ülkemizde KKKA vakalarının illere göre yoğunluğu (2010) (11)

Bulaşma Yolları (1, 5, 11, 22)

1) Kene ile bulaşma:

(a) Kene tutunması: Başlıca bulaş yoludur.

(b) Kene parçalanması/koparılması: Hayvanlardan kene temizlerken kenenin parçalanması, ezilmesi sonucu kenedeki virus cilt bütünlüğünün bozulduğu yerlerden veya mukozal temasla insanlara bulaşabilir.

2) Enfekte hayvanlardan bulaş:

(a) Viremik dönemde enfekte hayvanların kanı ile temas eden insanlara bulaş mümkündür.

(b) Enfekte hayvanın enfekte dokuları ile temas sonucu hastalık gelişebilir. Enfekte hayvanın yenmesi risk değildir, çünkü kesim sonrası dokularda oluşan asidemiyle viruslar inaktive olur ve pişirilme eyleminden etkilenirler.

3) Hasta insan:

(c) Kan ve vücut sıvıları ile temas

(d) Enfekte doku

(e) Mukozal temas

(f) Anne sütü ile bulaş

(g) Yüksek riskli ev içi yakın temas sonucu hastalık bulaşı olabilir.

Literatürde enfekte hastalarla temastan sonra gelişen nozokomiyal KKKA epidemileri ve aile içi vakalar da bulunmaktadır. Bu epidemilerde mortalite oranları, kene ısırığından sonra gelişmiş KKKA olgularına göre yüksektir (3).

KKKA'nin bulaşmasında en tehlikeli durum, henüz tanı konulamamış ve kanaması olan KKKA hastasına müdahale etmek ve acil operasyona almaktır. Genel olarak tanı operasyondan sonra konmaktadır ve operasyon ekibindeki yaralanmalar bildirilmemektedir. Rusya'da bazı vakalarda enfeksiyonun hava yoluyla bulaşmasından şüphelenilmiş ise de bu durum kesinleştirilememiştir (3, 5). Ülkemizde resüssitasyon esnasında bir sağlık personeli ve iki hekimin enfekte oldukları bilinmektedir. Bu olgular aerosol oluşturan işlemler ve özellikle kanamalı hastalarda resussitasyon esnasındaki saçılmalar ile de hastalığın bulaşabildiğini göstermektedir. Anneden bebeğe horizontal geçiş olduğunu gösteren bir vaka da bildirilmiştir (23).

2.6. Risk Grupları

- Tarım işçileri
- Çiftçiler, hayvan bakıcıları
- Veterinerler ve teknisyenler

- Endemik bölgede görev yapan sağlık çalışanları ve laboratuvar çalışanları
- Mezbaha çalışanları ve kasaplar
- Açık arazide görev yapanlar
- Orman işçileri
- Askeri birlikler
- Kamp yapanlar
- Göçebeler

Risk altındaki en büyük grup endemik alanlarda yaşayan çiftçilerdir. Bu kişilerin çoğu tarım ya da hayvancılıkla uğraşmaktadır. Türkiye'de meydana gelen vakaların %90'ı çiftçidir (8, 9). Virus hayvanlarda hastalığa sebep olmamaktadır, ancak viremik olabilmeleri nedeniyle çitlik hayvanları ya da diğer hayvanlarla deri teması sonrası enfeksiyon geliştiği bildirilmiştir (3, 5).

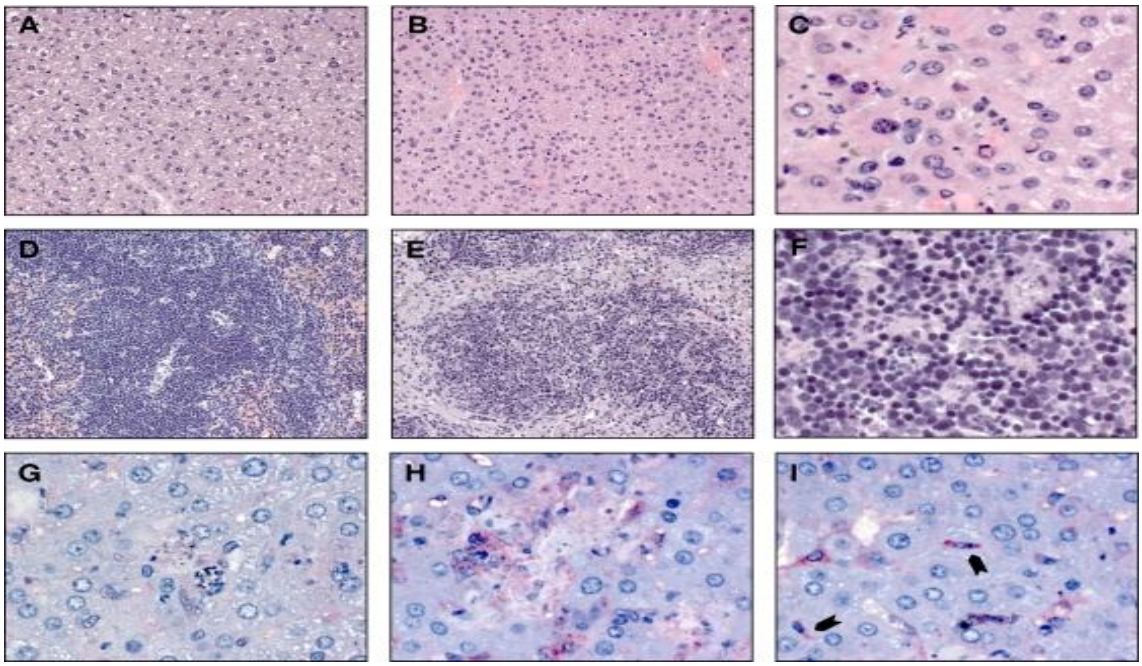
Veterinerler ve mezbaha çalışanlarının büyük evcil hayvanlarla çalıştıkları için risk grubunda olduğu bildirilmiştir (33). Virusla karşılaşma genellikle hayvanların kesimi sırasında olmaktadır. Bu sırada enfekte olan vakalardaki en olası kaynak, subklinik enfekte hayvanın viremik kanı olabilir, fakat bu işlemler sırasında kişilerin kenelere karşı korunmasız olması da olasıdır (3). Hayvan eti bekletildiğinde veya işlendiğinde dokudaki pH'nın düşmesine bağlı olarak virusun infektivitesinin kaybolduğuna inanılmaktadır. Dolayısıyla bu etler bir tehlike arz etmemektedir (24). Sağlık çalışanları en fazla etkilenen ikinci gruptur. Sağlık çalışanlarda, KKKA virusu ile enfekte hastanın kanamalarının olması, nozokomiyal geçiş için ciddi risk oluşturmaktadır. KKKA enfeksiyonunun toplumda ortaya çıkışıyla paralel olarak sağlık çalışanlarına geçtiği ve ölümlere sebep olduğu bildirilmiştir (3).

2.7. Patogenez

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'nin patogenezi tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Çoğu zaman vakalar sporadiktir. Hasta sahipleri otopsiye izin vermemektedir ve genellikle hastalık imkanları sınırlı, gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. KKKA üzerindeki çalışmaları kısıtlayan başka faktörler, özel laboratuvarların gerekmesi ve hastalığın hayvan modellerinin azlığıdır. Bu nedenle, patogenez hakkındaki sınırlı bilgiler, KKKA hastalarının kan değerleri ve karaciğer biyopsilerinden elde edilmiştir.

KKKA'nin klinikopatolojisi ile ilgili en geniş çalışma Swanepoel ve arkadaşları tarafından 1981-87 yılları arasında Güney Afrika'da KKKA tanısı almış 50 hasta üzerinde yapılan çalışmadır. Çalışmaya alınan 50 hastadan 15 hasta kaybedilmiştir. Mortaliteye eşlik eden faktörler, beyin kanaması, şiddetli anemi, şiddetli dehidratasyon, miyokard enfarktüsü, akciğer ödemi ve plevral efüzyondur. Ölen hastalarda beyin, karaciğer, böbrek, kardiak ve

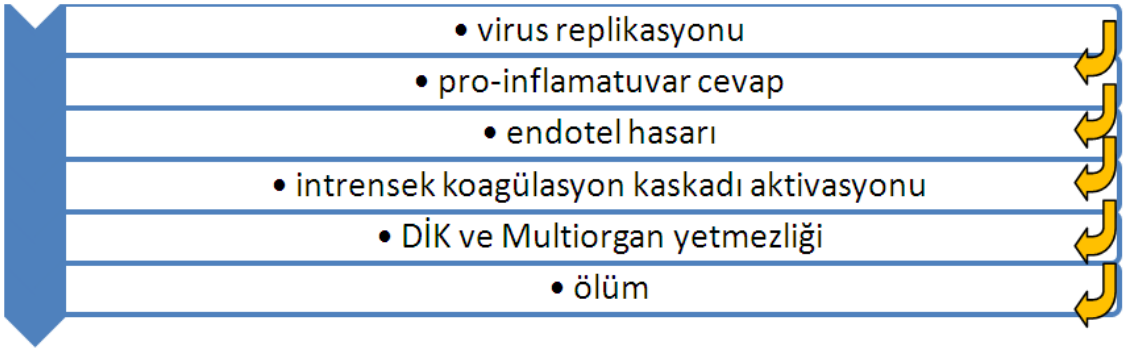
pulmoner yetersizlik gibi çoklu organ yetmezliği gelişmiştir. Karaciğer lezyonları yaygın nekrotik odaktan masif karaciğer nekrozuna kadar değişkenlik göstermiştir. Nekrotik hepatositler amorf kitleler şeklinde görülürler ve inflamatuar yanıt çok azdır veya yoktur. Ölen hastalarda çok az bir antikor yanıtı tespit edilmiştir (5).



Şekil 6. KKKA virusu ile infekte edilmiş farelerin postenfeksiyöz 3. günde çeşitli organlardaki histopatolojik değişikliklerin hemotoksilen eozin boyası ile boyanmış mikroskobik görünümleri.

(A) Karaciğer, (D) dalak,. Karaciğerde multifokal hepatoselüler nekroz bölümleri (B ve C), Orijinal büyütme panelleri × 200 A ve B; panel C × 630 büyütme. Dalakta belirgin lenfosit kaybı ve karyorektik debris (E ve F). Orijinal büyütme paneller × 200: D ve E; × 630 F paneli. Kupffer hücreleri (siyah ok) (25 nolu kaynaktan alınmıştır).

KKKA patogenezi diğer VKA'lere benzer (26). Bulaş yollarıyla vücuda giren virus deride, derialtı dokusunda ya da bölgesel lenf bezlerinde çoğaldıktan sonra kana geçer. Başta retiküloendoteliyal sistem (RES) olmak üzere pek çok organa yerleşir. Replikasyonla bu organlarda çoğalır ve sekonder viremi yapar. Mononükleer fagositer sistem uyarılması, sitokin salınımı ve endotel hasarı ile sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) gelişir. Endotel hasarı doğrudan virusun direkt etkisinden çok virusun salınımının neden olduğu proinflamatuvar sitokinlerce oluşturulduğu düşünülmektedir (5, 26). Endotel hasarı intrensek koagülasyon kaskadını aktifler, trombosit adezyon ve agregasyonunu artırır ve sonuçta dissemine intravasküler koagulasyon (DİK) gelişir. Multiorgan yetmezlik sendromu (MODS) ve yaygın kanamalar ortaya çıkar (26-29).



Şekil 7. KKKA'inde patogenezin şematik gösterimi

KKKA hastalarında trombositopeni daima vardır. Nedeni hemofagositoz, kemik iliği hipoplazisi ve endotel hasarına bağlı trombosit yıkımıdır (9, 30, 31). Virusun hepatositlere doğrudan sitopatik etkisi karaciğerde yaygın nekroza ve karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Karaciğerdeki hasara bağlı olarak koagülasyon faktörlerinin sentezi bozulur ve hepatosit yıkımına bağlı olarak serum karaciğer enzim düzeyleri artar (27, 28, 30, 32, 33). KKKA hastalarında gelişen aneminin nedeni hemofagositoz, kemik iliği hipoplazisi ve kanamalardır (34, 35). KKKA'inde proinflamatuvar sitokinlerle ilgili yapılan bazı çalışmalarda (29, 33, 36) proinflamatuvar sitokinlerin arttığı gösterilmiştir. Ancak yapılan bir çalışmada IL-12'nin azaldığı ve TNF-α'nın ise sadece ölen hastalarda arttığı gösterilmiştir (37).

Dalakta lenfoid hücre tükenmesi, fokal nekroz ve periarteryel kılıflarda dağınık lenfoblastlar görülmüştür. Akciğerde diffüz alveolar hasar, alveol içine kanama, hyalen membran formasyonu ve mononükleer interstisyel pnömoni vardır. Myokardda konjesyon ve hafif interstisyel ödem oluşur. Ancak bu histolojik değişiklikler patognomonik olmayıp, benzer bulgular diğer VKA ile bazı viral, riketsiyal, bakteriyel enfeksiyonlarda ve toksik durumlarda da saptanır (28). KKKA'inde böbrek tutulumunun ise, sitokinler aracılı intrarenal hemodinamik bozulmaya bağlı olduğu bildirilmektedir (27). KKKA'inde böbrek tutulumu ancak çok ciddi olgularda görülen nadir bir bulgudur.

2.8. Klinik Özellikler

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi diğer viral hemorajik ateşlerle birçok ortak klinik özelliğe sahiptir (38). Enfeksiyonu alan her 5 kişiden 1'inde KKKA gelişir (5). İnsanlar, KKKA virusunun hastalık meydana getirdiği tek konak gibi görünmektedir (5). Diğer vertebralıların çoğunda fark edilmeyen hastalığa karşın, KKKA virusunun insan infeksiyonu şiddetli kanama ile sonuçlanabilmektedir.

KKKA'nin tipik seyri dört dönem olarak gerçekleşir. Bu dönemler; inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve iyileşme dönemleridir (3). Bu dönemlerin süreleri ve belirtileri büyük oranda değişiklikler gösterebilir (Şekil 8).

Bir haftadan kısa bir inkübasyon periyodundan sonra hastalarda aniden ateş, ciddi baş ağrısı, kas ağrısı, bulantı, diyare ve diğer nonspesifik semptomlar başlar. Ağır hastalarda hızlı bir şekilde dissemine intravasküler koagülopati (DİK) gelişebilir, kanama ve şok görülebilir (38).

2.8.1 İnkübasyon dönemi

Kene ısırığından sonra inkübasyon dönemi, 1-3 gün gibi kısa olabilir. Kan veya çiftlik hayvanı dokusu ile etkilenenlerde beş gün ve insan vakalarının kanına temastan sonra 5-6 gündür. Semptomların başlamasıyla hastaneye başvuru arasındaki süre 3,5 - 5,5 gün arasında değişmektedir. İnkübasyon dönemindeki değişikliklerin ve hastalığın sonuçlarının virus soyuna veya viral doz gibi diğer faktörlere bağlı olabileceği varsayılmaktadır (5).

2.8.2. Prehemorajik dönemi

İnkübasyon döneminden sonra, prehemorajik dönem, halsizlik, ateş, döküntü (makülopapuler), şiddetli baş ağrısı, titreme, fotofobi ve sırt ve bel ağrısının ani başlangıcı ile karakterizedir (3, 5, 8, 15). Bazı hastalarda diyare, mide bulantısı ve kusma ek semptomlar olarak görülebilir (5). Yüzde, boyunda ve göğüste hiperemi, sklera ve konjuktivalarda kanlanma olabilir. Bazı hastalarda ishal, karın ağrısı bulunabilir. Prehemorajik dönem ortalama 3 gün sürmektedir (1-7 gün) (3). KKKA'nde ateş aralıklı veya sürekli olabilir genellikle ilk 5 günde saptanır. Bazı KKKA hastalarında nöropsikiyatrik değişiklikler olduğu görülmüştür (5). Bradikardi ve düşük kan basıncı gibi kardiyovasküler değişiklikler de meydana gelebilir (39).

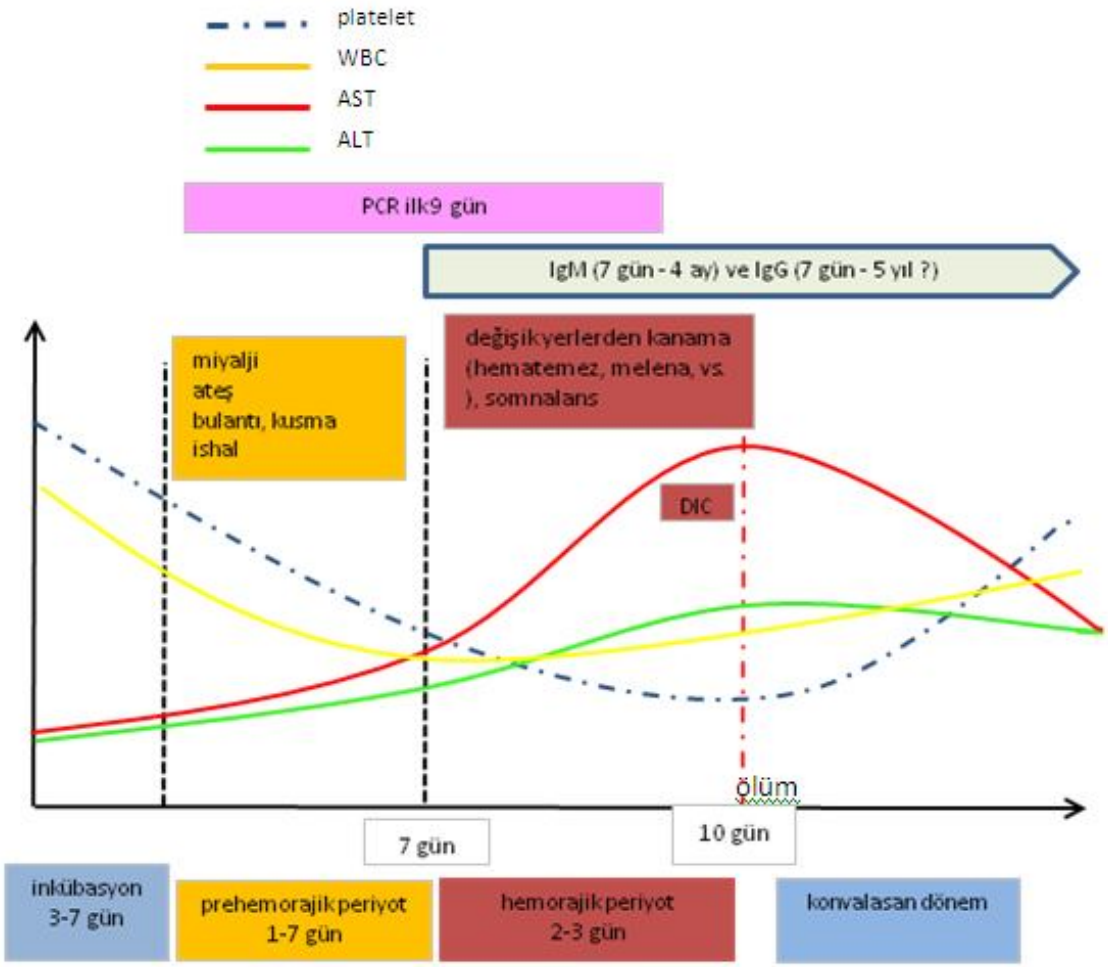
2.8.3. Hemorajik dönem

Genellikle kısadır (2-3 gün) ve hızlı gelişir. Ateşli hastada ateşin derecesi ile kanama arasında ilişki bulunamamıştır (3). Kanama müköz membranlarda ve deride peteşiden geniş ekimozlara kadar kendini gösterir (3, 38). Diğer bölgelerden kanamalar (vajina, diş eti kanaması) ve serebral hematom bildirilmiştir (3). En sık kanayan bölgeler burun, gastrointestinal sistem (hematemez, melena, intraabdominal kanama), uterus (menometroraji),

üriner sistem (hematüri) ve respiratuar sistemdir (hemoptizi) (5). Aynı zamanda atipik kanamalar da görülebilir (3).

Çok şiddetli vakalarda beyin kanamaları rapor edilmiştir. Beyin kanaması ve masif karaciğer nekrozu olan vakalarda prognoz çok kötüdür (3). Her üç hastadan birinde hepatomegali ve splenomegali bildirilmiştir (3). Türkiye'de % 20-40 hastada hepatomegali bulunmuş (8-10) ve splenomegalinin ise % 14-23 sıklıkta olduğu bildirilmiştir (5). Çeşitli KKKA epidemilerinin mortalite oranları değişkenlik göstermektedir. Birleşik Arap Emirlikleri ve Çin'de % 72.7 ve % 80 gibi çok yüksek mortalite oranları bildirilmiştir (3, 5). Ülkemizde 2002 – 2010 yılları arasında görülen KKKA hastalarında mortalite oranı % 5'dir (11).

Viremi, kanama ve şok başlangıcında düşme eğilimindedir (38). Diğer viral hemorajik ateşlerde olduğu gibi interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF-α) gibi proinflamatuvar sitokinler hastaların plazmasında saptanmış ve düzeylerin fatal olgularda fatal olmayanlara göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür (38). Bir çalışmada (58) viral yükün 10^8 kopya/mL'den yüksek olması kaybedilen ve yaşayan hastaların ayırımında kuvvetli bir gösterge olarak bulunmuştur. Duh ve arkadaşları (40) ile Çevik MA ve arkadaşlarının (41) yaptığı çalışmalarda viral yükün 10^9 kopya/mL'den yüksek olması fatal seyir açısından anlamlı bulunmuştur. Viral yük hastalığın sonuçlarının tahmininde kullanılabilir.



Şekil 8. KKKA'nin klinik ve laboratuar seyri (DIC: Dissemine intravasküler koagülopati) (3)

Tablo 3. Ülkemizde 2011 yılına kadar izlenen KKKA hastalarının başlıca semptomları (11)

Semptom	Yüzde (%)
Halsizlik	84.6
Ateş	79.6
Yaygın vücut ağrısı	69.8
Baş ağrısı	67
Bulantı	55
Kusma	34.8
Karın ağrısı	23.8
İshal	21.8
Kanama	11.8
Döküntü	8.8
Vücutta morluk (ekimoz)	5

2.8.4. İyileşme dönemi (Konvelesan periyod)

Hastalıktan kurtulabilenler için iyileşme süreci, hastalığın başlangıcından itibaren 15-20 gündür. Genellikle uzamış düşkünlük, bradikardi, saç dökülmesi, nöropati, baş ağrısı, baş dönmesi, iştahsızlık, görme bozukluğu, hafıza kaybı görülebilir (3). Hepatorenal yetersizlikler Güney Afrika'da (9) bildirilmesine rağmen Türkiye'de görülmemiştir. Hastalık geçirenlerde koruyucu bağışıklık gelişmektedir. Hastalığın bifazik seyri Sovyetler Birliği'nde yayınlanmış, ancak Türkiye'de görülmemiştir (3).

2.9. Tanı

Erken tanı, hem hasta için hem de nozokomiyal yayılımı önlemek için çok önemlidir. Şüpheli vakalar olası hasta tanımına uygunluğu açısından değerlendirilmelidir. Klinik belirtiler, hastanın öyküsü, özellikle endemik alanlara seyahat, kene ısırığı öyküsü veya hasta insan ya da çiftlik hayvanının kan veya dokuları ile temas öyküsü sorgulanmalıdır.

2.9.1. Non-spesifik laboratuvar testleri

Trombositopeni KKKA'nin en sık saptanan laboratuvar bulgusudur (3, 5). Hastaların lökopenisi de vardır. Asparat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve kreatin fosfokinaz (CPK) değerleri yükselmiştir. Hastaların bir kısmında protrombin zamanı (PT), aktive parsiyel tromboplastin zamanları (PTT) ve INR (international normalization ratio) gibi kanama testleri uzamıştır. Fibrinojenin değeri akut fazda artar, DİK gelişirse azalır ve fibrin yıkım ürünleri artar. Hayatta kalan hastalarda tam kan sayımı ve biyokimyasal testlerin de dahil olduğu laboratuvar testleri yaklaşık 5-9 gün içinde normal değerlerine dönmektedir (3).

2.9.2. Virüs izolasyonu

Virusun izolasyonu veya kültürüne yönelik çalışmalar mutlaka dördüncü biyogüvenlik düzeyi olan laboratuvarlarda yapılmalıdır. KKKA virusu kültürü için geleneksel metod, yenidoğan fareye beyin içi veya periton içi virus inokülasyonudur. İnokülasyon sonrası virus ile hastalanan fareler 4-6 günde ölürler (42). Virusu hücre kültüründe üretmek daha kolaydır ve daha hızlı sonuç verir, fakat sensitivitesi daha düşük kabul edilmektedir. Hücre kültürlerinde, inokülasyondan 4-7 gün sonra izole edilebilmektedir (32).

2.9.3. İmmünolojik yöntemler

KKKAV enfeksiyonunun serolojik tanısı nükleoprotein antijenine karşı immun cevap olarak üretilen spesifik IgM ve IgG antikorlarının tespiti esasına dayanır (3, 5). Hem IgG hem de IgM antikorları IFA testi ile hastalığın başlangıcından yaklaşık yedi gün sonra ve sağ kalanların serumunda dokuzuncu günde tespit edilebilir (5). IgM en erken dördüncü günde tespit edilmiştir (43). Enfeksiyon sonrası dördüncü ayda IgM antikor seviyesi tespit edilemez düzeylere düşer ve IgG titreleri de aynı zamanda düşmeye başlar, fakat beş yıl boyunca kanda gösterilebilir. Enfeksiyon, serokonversiyonun gösterilmesi veya farklı serum örneklerinde antikor titresinde dört kat veya daha fazla artış olması veya tek bir örnekte IgM antikoru gösterilmesi ile tanınır (3, 5, 38). Ölümcül vakalarda antikor cevabı nadiren gözlenmektedir (38).

ELISA metodu, immünofloresan yöntemler ve nötralizasyon antikor testlerine göre oldukça özgül ve duyarlıdır (3).

2.9.4. Moleküler yöntemler

Enfeksiyöz hastalıkların moleküler tanısı çoğunlukla nükleik asit odaklıdır. Mikroorganizmadan veya klinik materyalden elde edilen nükleik asit sınırlayıcı endonükleaz enziminin jel elektroforez ve nükleik asit hibridizasyon tekniklerinin kullanımına dayanır (44). Dolaşan virus Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile saptanabilir (64). RT-PZR gibi moleküller temelli tanı yöntemleri, tanıya yararlı tamamlayıcı yöntemlerdir ve günümüzde KKKA'nin, diğer kanamalı hastalıklarda olduğu gibi, erken dönemde tanısı için ilk test olarak kullanılmaktadır (5). Bu tür yöntemlerin kullanımının yararları çok fazladır. RT-PZR virusun genetik materyalini tanıdığı için, yüksek derecede özgüldür. Moleküller tanı yöntemlerinin diğer bir yararı, virus kültürü ile karşılaştırıldığında, örneğin alımından itibaren sekiz saat içinde tanı koymaya imkan vermesidir.

Ayrıca PZR viral yükün saptanmasını sağlar ki; vireminin düzeyi prognozun ciddiyetini gösterir, 10^9 genom/mL'yi aşan plazma düzeylerinde beklenen ölüm oranı, daha yüksektir, fatal olgularda ortalama viral yük, yaşayanlardan yaklaşık 1000 kat daha yüksektir (40, 45).

Konvansiyonel RT-PZR yöntemindeki ilerleme, otomatize Real-time çalışmalarını geliştirmiştir. Real-time PZR çalışmasının, konvansiyonel PZR metoduna göre pek çok avantajları vardır. Bunlar düşük kontaminasyon riski, hızlılık, yüksek duyarlılık ve

özgüllüktür. Saatler içinde sonuç alınabilir (5). Ülkemizde KKKA tanısı için IFA, ELISA (IgG ve IgM) ve PZR kullanılmaktadır.

2.10. Ayırıcı Tanı

KKKA başta VKA sendromları olmak üzere, akut gastroenterit, viral ve toksik hepatitler, tifo, şigelloz, falsiparum sıtması, riketsiyoz, leptospiroz, borreliyoz, erlihyoz, septik şok, toksik şok sendromu, meningokoksemi, tripanozomiyazis, septisemik veba, kızamık, kızamıkçık, hemorajik çiçek, sistemik inflamatuar yanıt sendromu (SIRS), bruselloz, babesioz, Q ateşi, diğer riketsiya enfeksiyonları, lyme hastalığı, tularemi, uzak doğu ve Orta Avrupa kene-ısırığı ensefalitleri, Kolorado ateşi, Kayalık Dağlar benekli ateşi ile karışabilir. Ayrıca kanama diyetezi ile seyreden noninfeksiyöz tablolardan idiyopatik trombositopenik purpura (ITP), akut lösemi, hemolitik üremik semdrom (HÜS), trombositik trombositopenik purpura (TTP), dissemine intravasküler koagulasyon (DİK), kollagen vasküler hastalıklar ve zehirlenmelerle de karışabilir (5). Afrika'da Lassa Ateşi ve Filovirüsler, Ebola ve Marburg virus infeksiyonları ayırıcı tanıda mutlaka düşünülmelidir.

2.11. Tedavi

Kırım-Kongo Kanamlı Ateşi için tedavi seçenekleri sınırlıdır. Destek tedavisi günümüzde hala hastalığın esas tedavisidir. Hastaların vital bulguları yakından takip edilmelidir. Mekanik ventilatör ihtiyacı olan hastalarda yoğun bakım gereksinimi olabilir. Hastalar, hemodinamik yönden yakın takip edilmeli, sıvı ve elektrolitler dikkatle izlenip eksik olan parametreler yerine konmalıdır. Kardiyotonik, vazopressörler ve sedatifler ihtiyaç haline kullanılabilir (46).

Hematolojik parametreler yakından izlenmeli, gerekirse trombosit ve pıhtılaşma faktörleri yerine konulmalı, ciddi kanama durumunda tam kan transfüzyonu yapılmalıdır. Bununla birlikte, kan ürünleri empirik olarak verilmez, klinik ve laboratuvar değerlendirme sonucunda verilmelidir.

Trombosit süspansiyonu transfüzyonu, kanamalı hastalarda ve cerrahi girişim yapılacaklarda trombosit sayısı <50,000/ml ise ve kanaması olmayan hastalarda trombosit sayısı <10,000/ml ise uygulanmalıdır (1-2 U/10 kg) (26).

Taze donmuş plazma (TDP, 15-20 ml/kg), INR'nin 1,5 üzerine çıktığı durumlarda verilmesi düşünülebilir. Taze donmuş plazma yerine, fibrinojen konsantreleri (total doz 2-3 g) veya kriyopresipitatlar (1 U/10 kg) verilebilirse de TDP, DİK'te eksik olan tüm koagülasyon

faktörlerini kapsadığından teorik olarak daha avantajlıdır. Vitamin K (ardışık 2 gün, 10 mg) DİK'li hastalarda özellikle altta yatan karaciğer hastalığı olanlarda verilebilir (26).

Trombositler için toksik olan ya da fonksiyon bozukluğu yapan nonsteroid antiinflamatuarlar, aspirin, antikoagülan tedavi ve intramuskuler injeksiyon kontrendikedir. Ayrıca steroidler de tedavide kullanılmaz (26, 46).

İyileşen ve bağışıklık gelişen hastalardan elde edilen immün serum ile yapılan pasif immünizasyonun hastalığın erken döneminde kullanılmasının faydalı olabileceği izlenimleri mevcuttur (46, 47). Ülkemizde de bu amaçla araştırmalar devam etmektedir.

Plazmaferezin hastalığın tedavisinde etkili olduğunu söyleyen çalışmalar olsa da bu şekilde tedavi uygulanmış hasta sayısı çok azdır ve daha geniş hasta gruplarında uygulanmasından sonra etkinliğini değerlendirmek doğru olacaktır.

KKKA'nin özgül antiviral tedavi planı yoktur. Kullanılabilecek tek antiviral ilaç ribavirindir (5) denilse de KKKA'nde ribavirin kullanımı halen tartışmalıdır. Basit metodlarla invitro olarak ilaç denemeleri yararlı bulunmuş, ancak yenidoğan farelerden başka hayvan modelinin olmaması tedaviyi geliştirme çabalarını engellemektedir (38). Ribavirin etkisi ancak gözlemsel ve geriye dönük kontrollü çalışmalarla tanımlanmış olup çalışmaların bir kısmında mortaliteyi azalttığı (10, 48, 49), bazılarında değiştirmediği (50) gözlenmiştir. Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada ise ribavirinin, KKKA hastalarının seyri ve mortalitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (51). Oral ribavirinde olduğu gibi IV ribavirin de ülkemizde yapılan bir çalışmada mortalite üzerine etkisiz bulunmuştur (52). KKKA tedavisinde ribavirinin etkinliğini ortaya koymak için kanıt düzeyi yüksek olan çalışmalar mevcut olmadığı gibi, etkili olmadığını gösteren hatta ilk sekiz günde mortaliteyi artırdığını iddia eden çalışmalar da vardır (51). Ayrıca ribavirin verilen hastalarda pek çok yan etki ortaya çıkmaktadır. Hastalarda hipomagnezemi, hipokalsemi, hemolitik anemi bildirilmiştir (53). Bu konuya açıklık getirmek amacıyla ülkemizde Sağlık Bakanlığı koordinatörlüğünde çok merkezli randomize kontrollü çalışma başlatılmış ve halen devam etmektedir.

Hastaların kan ve kan ürünleriyle parenteral teması söz konusu olduğunda profilaktik olarak günde dört defa 500 mg oral ribavirin 7 gün süreyle verilmesi önerilmektedir (1). Temaslının en az 14 gün kadar ateş ve diğer belirtiler yönünden takip edilmesi gerekmektedir (47). Ateş $\geq$ 38,3 olduğu takdirde hasta olarak değerlendirilmelidir.

Bu hastalık için yeni etkin tedaviler geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır ve daha temel araştırmalar yürütüldükçe, hastalığın kontrolü için yeni yaklaşımlar mutlaka ortaya çıkacaktır.

2.12. Korunma ve Kontrol

Hastalıktan korunmanın en güvenilir yolu virusa maruz kalmaktan kaçınmak veya en aza indirmektir. Bu pek çok yolla yapılabilir. Endemik bölgelerde yaşayan insanlar, kenelerin yoğun olduğu bölgelerden uzak durmalı, sık sık kene ısırıklarını kontrol etmeli, vücudun açık yerlerini kapatmak gibi kişisel korunma önlemlerine dikkat etmelidirler (47). Veterinerler, mezbaha işçileri, hayvancılıkla uğraşanlar eldiven ve uzun önlükler kullanmalı, infekte doku ve kan ile direk temas etmemelidirler (47).

Benzer şekilde KKKA hastalarına bakan tıbbi personel standart bariyer önlemlerini uygulamalıdır. Sağlık çalışanlarının, hastalarla ya da kirlenmiş ortam yüzeylerine temasta, bariyerli bakım ve tavsiye edilen izolasyon tedbirlerini (eldiven, elbise, yüz maskeleri, yandan korumalı gözlükler) almaları gerekir. Serolojik olarak ayırımı yapılana kadar standart bariyer tedbirlerine tamamen uyulursa hiçbir sağlık çalışanı KKKA açısından risk altında değildir (3). Viral materyal ile çalışan laboratuvar çalışanları da hastalık gelişimi için yüksek risk altındadır. Bu nedenlerle Amerika'da hastalık kontrol ve koruma merkezi (CDC), KKKAV'nu seviye dört biyogüvenlilik gerektiren patojen olarak sınıflandırılmıştır (1).

Diğer kene ile bulaşan hastalıklar gibi, kişinin bedenini ve kıyafetlerini keneler açısından araştırması ve erken uzaklaştırılması hastalığın bulaşmasını en aza indirebilir (3). Hastalıktan korunmak için henüz uygulanan etkin ve güvenli bir aşı yoktur. Ülkemizde Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi tarafından yürütülen aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

2.13. Kötü Prognoz Kriterleri

Swanepoel ve arkadaşları, laboratuar kriterleri ile hastalığın seyrini (ilk beş gün içinde) değerlendirmede bazı kriterlerin varlığında mortaliteyi %90'a kadar tanımlayabilmişlerdir (3). Bu kriterler; beyaz küre sayısı 10000/ml'nin üzerinde, trombosit sayısının 20.000/ml'nin altıda olması, AST seviyesi 200U/L, ALT seviyesi 150U/L, aktive PTT 60 saniye ya daha uzun, ya da fibrinojen seviyesi 110 mg/dL veya düşük olmasıdır. Ağır seyirli vakalarda AST ve ALT seviyeleri dikkat çekici ölçüde yüksek bulunmuştur (54).

Türkiye'den bir çalışmada, AST ve ALT (>700 ve >900 U/L) değerinin yüksekliğinin, fatal vakaları bulmakta daha duyarlı olduğu görülmüştür. Lökositoz ölen dört hastadan sadece birinde görülmüştür (55). Konfüzyon, ense sertliği, birden fazla bölgeden kanama, uzun süren ateş (50), şuur bozukluğu, splenomegali (10), somnalans, hematemez, melena, yüksek ateş, DIC, böbrek yetmezliği (56) klinik olarak tanımlanmış kötü prognoz kriterleridir.

3. NİTRİK OKSİT

3.1. Genel Özellikler

Nitrik oksit (NO), farklı hücre tipleri tarafından kullanılan ve makrofaj, vasküler endotel hücreleri, kupffer hücreleri, adrenal ve serebral dokular gibi çeşitli hücreler tarafından üretilen önemli bir parakrin ve otokrin sinyaldir. NO'in vücutta, kan damarları dilatasyonundan, platelet agregasyonuna, infeksiyonla ve tümör hücreleri ile savaşa, inflamasyon mediatörlüğü ve makrofaj sitotoksik aktivitesine, sinir hücreleri arasında sinyal iletimine kadar geniş bir görev alanı vardır (57).

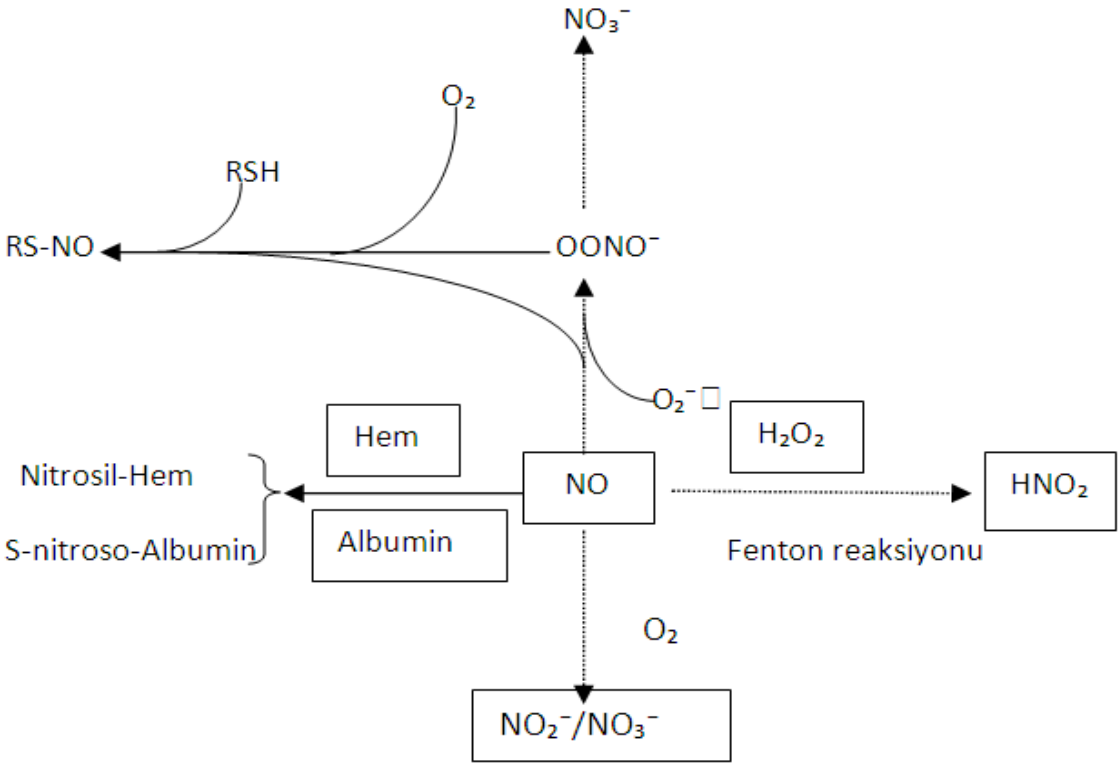
3.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

NO oda ısısında ve atmosferik basınç altında gaz durumundadır. Ancak biyolojik sistemlerin çoğunda çözünmüş nonelektrolit biçimindedir, diğer bir deyişle işlevlerini gerçekleştirirken çoğu kez gaz durumunda değildir (58).

Suda çözünürlüğü çok az olan NO, membran ve hücrelerin lipid fazında selektif olarak çözünür. Lipofilik ve yüksüz bir moleküldür. Yüksüz olduğu için sıvı ortamlarda serbestçe diffüze olabilir, hücre membranlarından rahatlıkla geçebilir (59).

NO paylaşılmamış elektron taşır ve paramagnetiktir. NO'in biyolojik sistemlerdeki kimyasal etkileşimleri bu paylaşılmamış elektronun stabilizasyonu ile karekterizedir. NO ile superoksit ($\bullet O_2$) etkileştiğinde peroksinitrit ($ONOO^-$) anyonu oluşur. Peroksinitrit kuvvetli bir oksidandır ve protanlandığında hızlıca nitrojen dioksit ($\bullet NO_2$) ve toksik metaboliti olan hidroksil ($\bullet OH$) radikaline bozunur. Hidroksil radikalinde 3 elektron redükte durumdadır ve oldukça reaktiftir.

Azotun değerliklerinden de anlaşılacağı gibi, $\bullet NO$, elektron verince NO^+; elektron alınca NO^- iyonlarına dönüşmektedir. NO'in bu değişik redoks formları biyolojik sistemlerde oluşan dual etkisini açıklar. Örneğin okside şekli (NO^+), glutamat reseptörlerini inaktive ederek eksitatör aminoasitlerin nörotoksik etkilerini azaltırken; indirgenmiş şekli (NO^-), superoksitle etkileşime girer ve güçlü bir nörotoksin olan peroksinitrit oluşturarak zarar verici olabilir (59).



Şekil 9. NO'in biyolojik reaksiyonları

NO, glutatyon ve sistein gibi sülfidril grubu içeren bileşikler ile S-nitrozotiolleri (RS-NO) oluşturabilir. NO, normal kişilerde mikromollük (µm) konsantrasyonlarda bulunmaktadır. RS-NO, serbest NO'i tamponlamaktadır. Bunlar NO deposu olarak düşünülebilir (60). NO metalloproteinlerdeki metaller ile kompleksler oluşturabilir. Hem içeren proteinlerle, özellikle hemoglobin ile tepkimeleri buna iyi bir örnektir. NO, non-Hem metal kompleksleri de oluşturabilir. Buradaki reaktivitesi özellikle Fe-S merkezlerine yöneliktir. Mitokondrial elektron transport zincirinde görevli proteinler ve akotinaz gibi enzimler bu gruba örnek verilebilir. Sitokinlerle aktive olmuş makrofajların etkileri yine non-Hem metal kompleksi grubundan olan Fe-dinitrozil-ditiyolat kompleksleri oluşumuna bağlıdır (60). NO nitralizasyon sonrası indirgenmiş (NO^-) hale geçer (59, 60). Bu nedenle metal nitrozilasyonu ile NO redoks formları arasında sıkı bir ilişki vardır (Şekil 9).

3.3. NO Sentezi

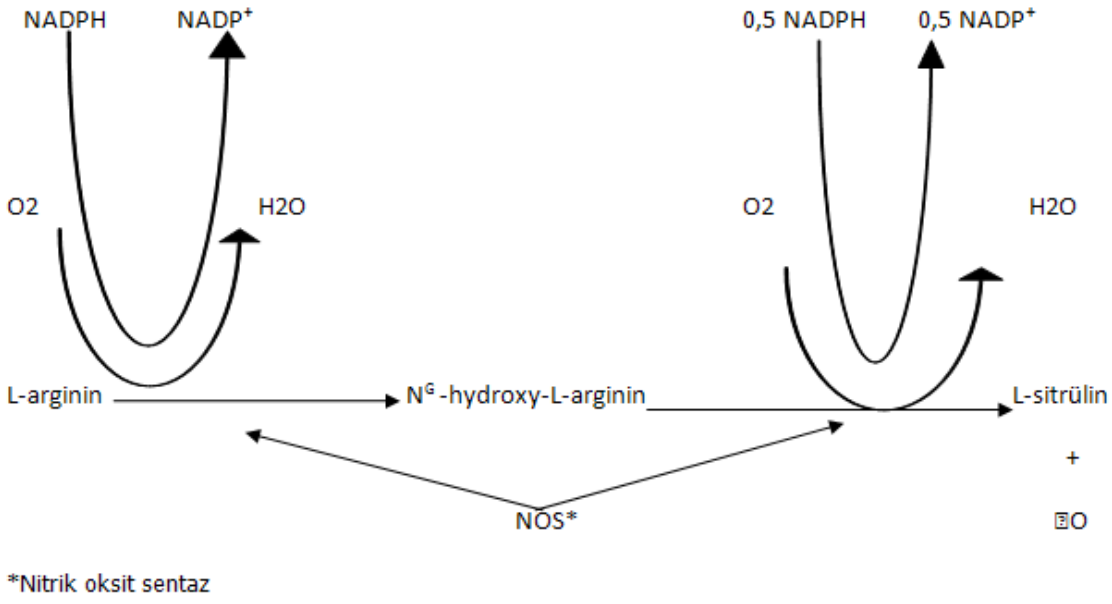
L-arginin amino asidinin NOS enzimiyle oksidatif deaminasyonu sonucu oluşur. Sonuçta L-sitrullin ve NO meydana gelir. Reaksiyonda nikotin adenin dinükleotiti fosfat (NADPH), flavin adenin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD) ve tetrahidrobiopterin (BH4) kofaktör olarak görev alır (Şekil 10) (61)

3.4. NO Sentaz (NOS) Enzimi

NOS'lar, 'yapısal-constitutive = cNOS' ve 'indüklenebilen = iNOS' olmak üzere temelde iki gruba ayrılır. Yapısal NOS ise endotelial ve nöronal NOS olmak üzere 2 çeşittir (Tablo 4).

3.4.1. Yapısal (constitutive) izoformlar (cNOS):

Endotelyal NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) olmak üzere iki ayrı izoformu vardır. eNOS endotel, trombosit ve beyinde bazı yapılarda; nNOS beyin, medulla spinalis, periferik sinir sisteminde ve sinir sistemi dışında bronş, trakea epiteli ve iskelet kasında bulunur. Yapısal izoformda enzim hücrede devamlı bulunur. Uyarıyla geçici olarak ve düşük miktarda NO yapılır. Yapısal NOS içeren hücrelerde NO sentezini başlatan sinyal sitozolik Ca^{+2} artışıdır. Artan Ca^{+2} kalmoduline bağlanır. Ca^{+2}- kalmodulin kompleksi NOS'a bağlanır ve NOS aktive olur. Nötrofillerde bulunan cNOS ise diğerlerinden farklı olarak kalmoduline ihtiyaç duymadan aktive olur.



Şekil 10. NO sentezi

3.4.2. İndükenebilen izoformlar (iNOS)

Başlıca makrofaj, insan hepatositleri ve kondrositlerden klonlanmıştır. iNOS kalmodulin bağlanmakla beraber aktivasyonu için Ca^{+2} bağımsızdır. Bakteriyel liposakkaritler

ve sitokinler (IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α, IFN-γ vb.) gibi immunolojik uyaranlara yanıt olarak sentezlenir. Oysa bu uyaranlar cNOS'u baskılar. Glukokortikoidler, transfoming büyüme faktör-β (TGF-β), makrofaj farklılaştırıcı faktör (MDF), IL-4 ve IL- 10 ile inhibe edilir (62). iNOS bir kere indüklenince kaynak hücrenin ömrü boyunca veya NO için gerekli substratlar bitinceye kadar bol ve sürekli NO sentezlenir. iNOS sentez regülasyonu transkripsiyon düzeyindedir. Bu nedenle NO sentezi yaklaşık 8 saat süren gecikmeyle gerçekleşir (63).

Tablo 4. NOS' ların özellik ve farklılıkları

	eNOS (NOS3)	**nNOS (NOS1)**	**iNOS (NOS2)**
Yapılığı yer	**Endotelial hücreler**	**Nöronal hücreler**	**Makrofajlar**
Etkilenen dokular	Kardiak miyositler Plateletler Nöronlar	İskelet kasları Nötrofiller Damar düz kas hücresi	Kardiak miyositler Glial hücreler Damar düz kas hücresi Endoteliyum Nöronlar
Major düzenleyici mekanizma	Ca^{+2}bağımlı (Ca-calmodulin) Ca^{+2} bağımsız (fosforilasyon,palmitoylasyon)	Ca^{+2}bağımlı (Ca-distrofin)	Ca^{+2} bağımsız Transkripsiyonel regülasyon
Subsellüler lökalizasyon	Golgi Plazmalemma	Sitozol Endoplazmik retikulum Sarkolemma Postsinaptik dentritler	Fagozomlar
Salınım özellikleri	Geçici, az miktarda	Geçici, az miktarda	Devamlı çok, miktarda
Sentezlenen miktar	Düşük, pmolar	Düşük, pmolar	Yüksek, µmolar
Yapım süresi	Kısa	Kısa	Uzun
Yanıt süresi	Derhal	Derhal	Gecikmiş
Aktivatörleri	Trombin, asetil kolin	Eksitatör aminoasitler	Endotoksin (LPS), sitokinler (TNF-α, IL-1, IL-6)
İşlev	Hücre sinyali	Hücre sinyali	Sitotoksik, sitostatik, sitoprotektif

3.5. NO Metabolizması

Sentezlenen NO, hücre membranları arasına diffüze olur, depolanmaz. Dokularda ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvılarda çabuk bir şekilde yıkılır. Eliminasyon yarılanma ömrü dokulara ve türe göre değişmek üzere 10-60 sn arasında değişir (64). NO, oksijen ve su ile nitrat (NO_3) ve nitritlere (NO_2) dönüşür. Nitrit ve nitratın biyolojik aktiviteleri yoktur. Bunlar endojen NO yapımının iyi birer göstergesidirler (57).

3.6. NO'in İşlevleri ve Biyolojik Etkileri

3.6.1. Haberci modülatör olarak işlevleri

NO, klasik nörotransmitter /modülatörlerden farklı olarak;

a- Sinaptik vezikülde depolanmaz, uyarımla sentezlenir.

b- Spesifik salıverilme ve geri alınma mekanizmaları yoktur.

c- Spesifik membran reseptörleri yoktur, hedef hücreye doğrudan penetre olarak enzim sistemlerini uyarır.

d- Spesifik enzimlerle metabolize olmaz, spontan oksidasyonla parçalanır ya da superoksit oksi hemoglobin gibi bileşiklerce tutulur.

e- Salıverilmiş klasik nörotransmitterlerde milisaniye olan yarılanma ömrü NO için saniyeler miktarındadır (65).

3.6.2. Fizyolojik etkileri

3.6.2.a. Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri

NO, vasküler endotel düz kas hücrelerine diffüze olarak guanilat siklaz enziminin (sGC) hem grubuna bağlanır. Bu enzimi aktif hale getirip düz kas hücrelerinde siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini yükseltir. cGMP düzeyinin artması vasküler düz kas hücrelerinde gevşemeye ve trombosit adezyon ve agregasyonunun inhibisyonuna neden olur (65). İnsanlarda NO bazal durumlarda sürekli olarak salıverilir ve oluşturduğu vazodilatatör etki ile damar resistansının düzenlenmesine katkıda bulunur (66). NO endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılmasında ve miyokard kontraktilitesinin regülasyonunda önemli role sahiptir. NO'in ateroskleroz gelişimini önleyici etkisine katkıda bulunabilir (67).

3.6.2.b. Santral ve periferik sinir sistemi etkileri

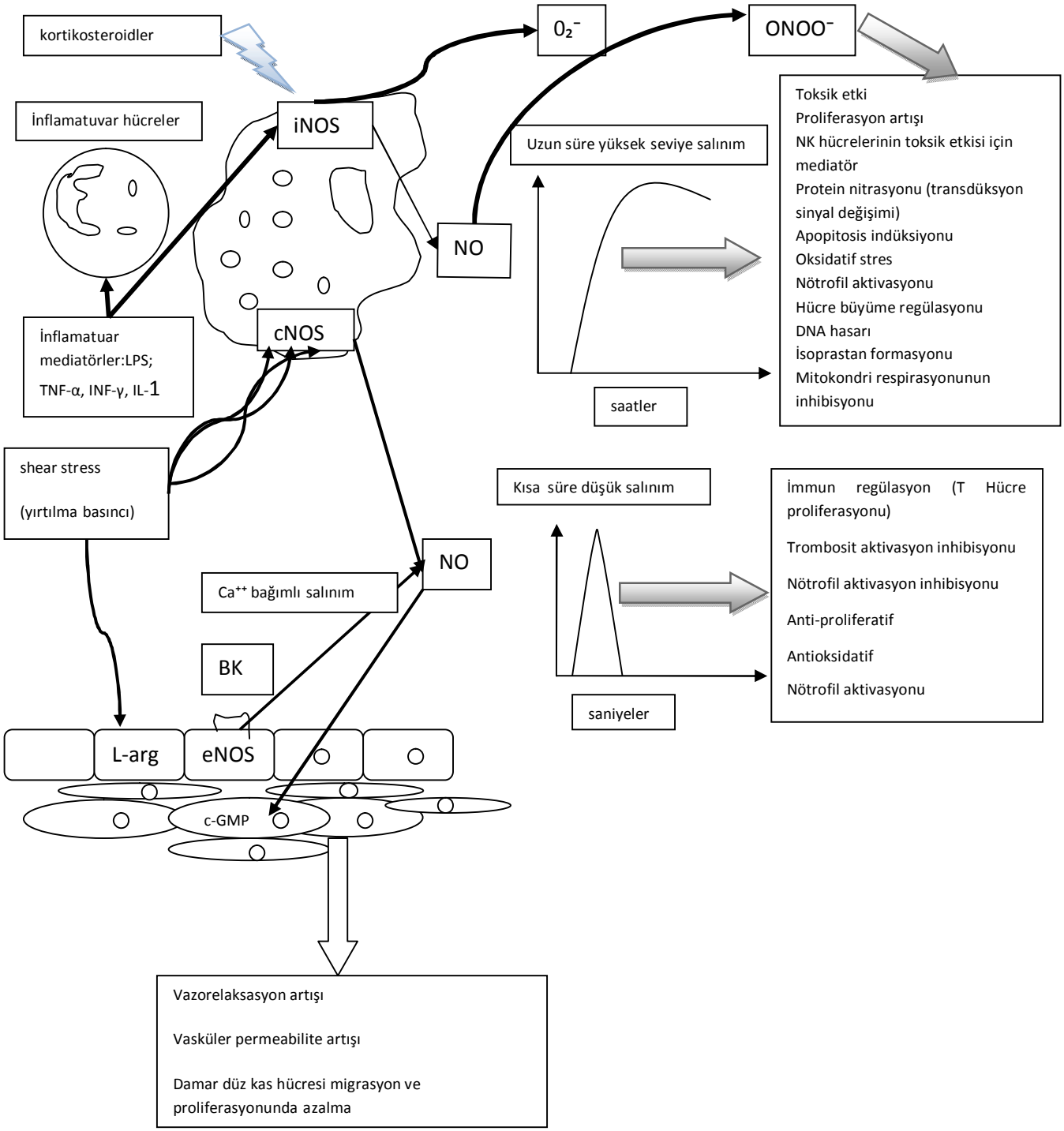
Glutamatın NMDA resptörlerini uyarması hücre içi kalsiyum düzeylerinin artışına ve sonuçta nNOS'in aktivasyonu ile NO oluşumuna yol açar. Burada da hedef enzim sGC (guanilat siklaz)'dır. NO, nörotransmitterlerin salıverilmesi ve endokrin fonksiyonların düzenlenmesinde, sinaptik plastisitede, hafıza ile ilgili olarak 'long-term potentiation' da görev alır. Santral sinir sistemindeki damarlarda bulunan eNOS serabrovasküler kan akımını düzenler. İnflamasyon travma, iskemi gibi bazı patolojik durumlarda astrosit ve mikrogliadaki iNOS indüklenir. NO'in belleğin oluşmasında (59), görme, koklama, ağrı ve açlık duygularının algılanmasında rolü olabileceği bildirilmiştir (67).

Otonom sinir sisteminde solunum, gastrointestinal ve ürogenital kanal düz kaslarının gevşemesini sağlayan non-kolinerjik, non-adrenerjik iletide NO'in spesifik haberci rolü iyice belirlenmiştir. Kalsiyumun N tipi kanallardan girmesi nNOS'ı kalmodulin aracılığıyla aktive ederek NO oluşur. NO, düz kas hücrelerine girerek çözünür ve guanilat siklazı uyarır. cGMP yükselir ve kas gevşer (65).

Birçok GIS patolojisinde NO sentezinde değişiklikler olmaktadır. Bağırsaklardaki nöromusküler bozuklukların patofizyolojisinde nöronlarda sentezlenen NO miktarının ve düz kas hücrelerinin endojen NO'e hassasiyetlerinin değişmesinin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Doku ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda NO'in epitelyum hücrelerinin geçirgenliğini etkilediği tespit edilmiştir. Sıçanlarda yapılan genetik çalışmalarda NO'in intestinal motiliteyi düzenlediği gösterilmiştir (68).

3.6.2.c. Diğer sistemler üzerine etkileri

NO oldukça selektif ve etkin bir şekilde pulmoner vazodilatasyon sağlar, penil ereksiyonun sağlanmasında NO'in etkilidir. Pankreas beta hücrelerinde cNOS bulunduğu ve fizyolojik şartlarda NO'in insülin salgılanmasına neden olduğu bilinmektedir. İnsanlarda uterus arterlerinde internal kalınlığın oluşumunda ve uterus kasılma ve gevşemesinde NO'in rolü olduğu öne sürülmüştür. NO'in cildin istirahat kan akımının devamını sağladığı, lokal ısı ve UV-B ışınlarına karşı vazodilatasyon yaparak koruyucu etki gösterdiği, travmaya cevapta, yanık ve yara iyileşmesine etkili olduğu, besin alımı, öğün sayısı ve süresi gibi beslenme davranışları üzerine olumlu etkileri olduğu, iştah ve besin alımını artırdığı (68) gösteren çalışmalar vardır (68). NO'in inflamasyon ve immunitede oynadığı önemli rol ayrıca aşağıda geniş olarak ele alınacaktır.



Şekil 11. NO salınımı ve bazı etkilerinin şematik gösterimi

3.6.3. İnflamasyonda NO'in rolü

NO, hem doku koruyucu hem de zarar verici olabilir. İnflamasyonda NO etkilerinin doza bağlı olduğu düşünülmektedir. Uygun konsantrasyonlarda antiinflamatuvar etkilidir. Aşırı NO sentezi inflamasyonu artırır ve konakta doku hasarına neden olur. Biyolojik sistemlerde üretilen yüksek konsantrasyonlarda NO'in zararlı etkileri üç mekanizma ile

gerçekleşir. Bunlardan ilki, NO'in oksijene benzer şekilde hücre içine geçerek, paylaşılmamış elektronu bulunan bir molekül olduğu için hücre içinde proteinlerin yapısında bulunan Fe gibi geçiş metallerine bağlanması ve ortama serbest demir salınmasına neden olmasıdır. İkincisi otooksidasyon ile N-nitroso bileşikleri oluşturarak DNA'ya zarar veren N_2O_3 oluşturmasıdır. Son olarak da NO, oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek DNA, proteinler ve hücre membran lipidlerini okside eden peroksinitrit üretir (69).

Nitrik oksitin akut ve kronik inflamasyon, sistemik iflamatuvar yanıt (SIRS) ve sepsiste rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (70-73). NO, vazodilatasyonu, vasküler permeabiliteyi ve damar dışına sıvı kaçışını artırır, ödem oluşturur ve hassas sinir uçlarını uyarır. Bakteriyel endotoksinler iNOS'ı uyarır ve kardiyomiyositlerde, endokardiyumda ve düz kas hücrelerinde NO sentezini artırarak venlerde kan birikmesine ve kardiyak fonksiyonların bozulmasına (sepsise bağlı dilate kardiyomiyopati) yol açar (60).

Deneysel menenjit modellerinde iNOS tarafında sentezletilen fazla NO'in inflamasyonu artırarak kan beyin bariyeri geçirgenliğini bozduğu, serebral ödemi artırdığı ve nöronal hasara neden olduğu gösterilmiştir (74, 75). Yapısal NOS (cNOS) ile üretilen NO normal fizyolojik olayların sürdürülebilmesi için gereklidir. İn vitro olarak NO'in nötrofil agregasyonunu azaltıp, lizozomal enzim salınımını ve CD11/CD18'i inhibe ederek lökositlerin damar duvarına adezyonunu azalttığı gösterilmiş ve antiinflamatuvar etkinliği bu şekilde ortaya konulmuştur (60).

3.6.4. NO'in immun sistem üzerine etkileri

İmmunolojik uyarı ile makrofajlar, nötrofiller, hepatositler, endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, astrosit ve mikroglia hücrelerinde bulunan iNOS aktive olur. Makrofajların endotoksin ve sitokinle uyarılması sonucu sentezlenen NO, mikroorganizmalar, tümör hücreleri ve kısmen de vücut hücreleri için sitotoksik ve sitostatik etki oluşturur (63).

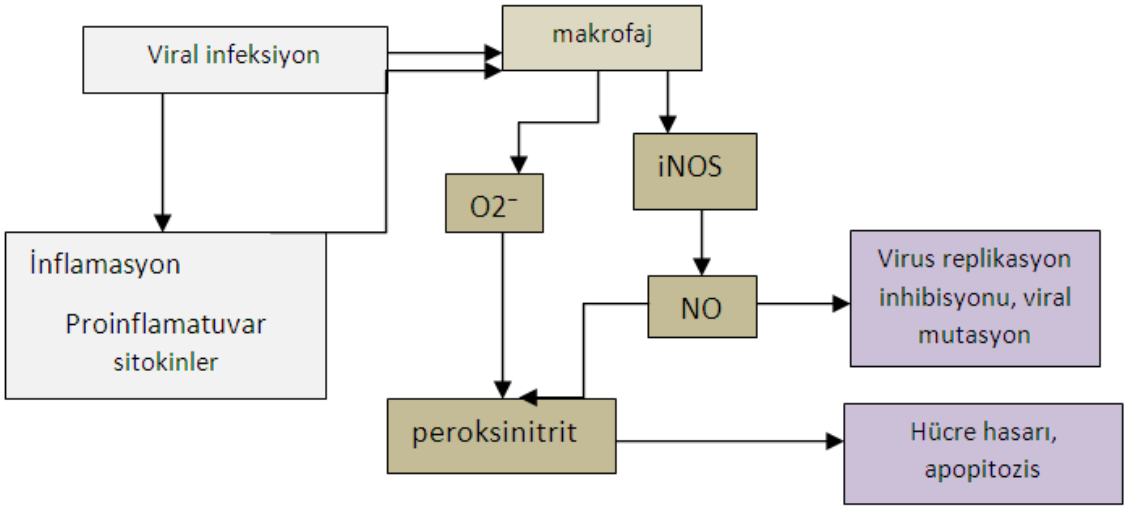
NO'in immun sistem üzerinde değişik rolleri vardır. İmmun sistem hücrelerini ve sitokin salınımını aktive de edebilir, inhibe de edebilir (57, 76, 77). T hücreleri proliferasyon ve aktivasyonları üzerine etkileri benzer şekilde artırma ya da azaltma yönünde olabilir (77, 78). p53 düzeyinde apopitozisi artırır veya azaltır (78).

NO'in sitokin sentezi üzerine etkileri değişiktir. TNF-α, IL-6, IL-12, granülosit koloni stimülan faktör (GCSF) sentezi için gereklidir (79, 80). Salınımında en etkili sitokin IFN-γ iken, IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β NO sentezini inhibe eder (81-83). NO'in negatif feedback

mekanizması ile Th 1 hücre büyümesini seçici olarak inhibe eder (83); ancak düşük konsantrasyonları güçlü bir Th-1 cevabı oluşturur (84, 85). NO'in düşük konsantrasyonları nükleer faktör-κB (NF-κB) aktivitesini upregüle eder ve yüksek konsantrasyonları downregüle eder (86, 87). NO aynı zamanda cGMP üzerinden T hücre alt tip yanıtı indüksiyonundan da sorumludur (88).

3.6.5. Viral enfeksiyonlarda NO'in rolü

Viral enfeksiyonlar sırasında NO'in virus ve konakçı üzerine değişik etkileri vardır. Virus replikasyonunu inhibe eder, viral mutasyona neden olur, konakçıda hücre hasarına yol açar (89) (Şekil 12).



Şekil 12. Viral enfeksiyonlar sırasında NO oluşum mekanizması (89 nolu kaynaktan)

3.6.5.a. NO'in virus replikasyonundaki etkileri

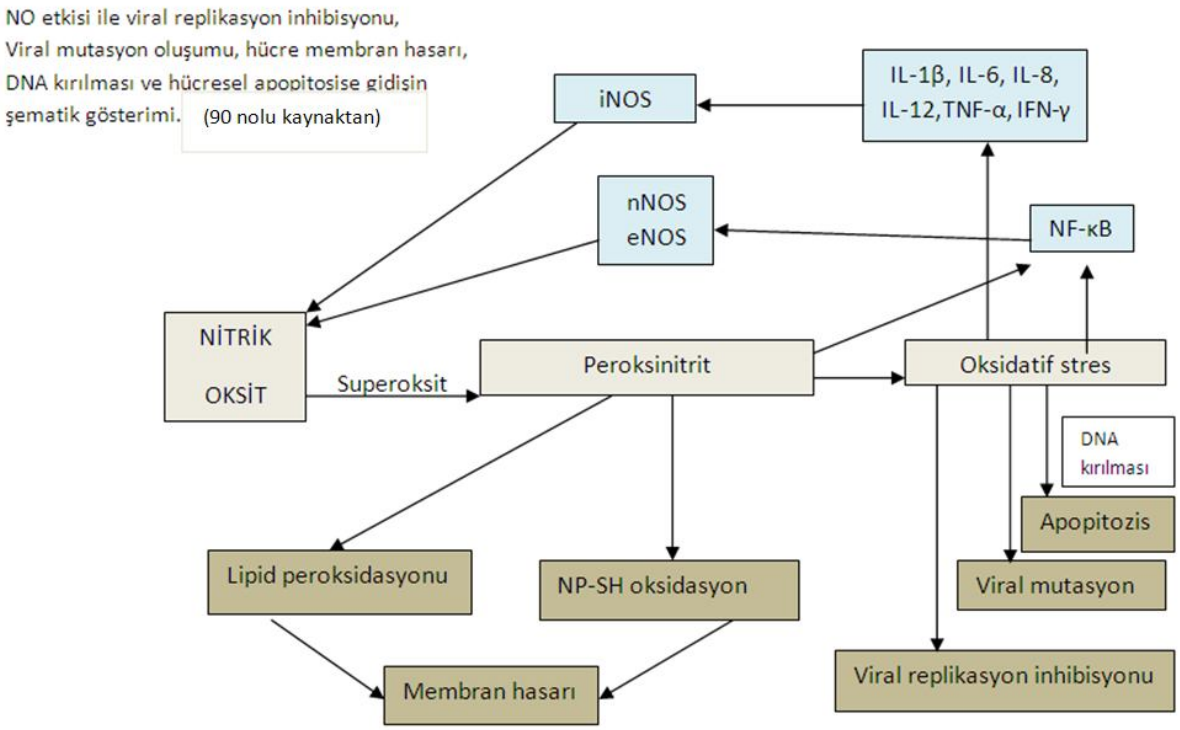
NO'in virus replikasyonu üzerine çeşitli etkileri vardır; genellikle replikasyonu inhibe ederken bazılarında etkisisizdir, bazılarında ise replikasyonu artırır (90, 91). Başlıca antiviral etkileri viral proteazların geri dönüşümlü S-nitrozilasyonu (91), peroksinitrit oluşumu ile virusun öldürülmesi (92, 93), 8-nitroguanozin oluşturarak viral mutasyona yol açması (89, 94), viral protein sentez inhihisyonu (89, 90) gibi değişik şekillerde olmaktadır. Şekil 14'de NO'in viruslar üzerine etkileri özet olarak gösterilmiştir.

3.6.5.b. Viral enfeksiyon süresince NO'in konak üzerine etkileri

NO ve peroksinitritin, enfeksiyon süresinde konak üzerine hem faydalı hem de zararlı etkileri olabilir. Peroksinitrit yüksek konsantrasyonlara ulaştığı zaman konakçı için zararlıdır, lipitleri ve DNA'yı okside eder, proteinleri okside eder ya da nitrasyonlarına neden olur. Halbuki peroksinitritin düşük konsantrasyonları enfeksiyon boyunca patojene karşı faydalı olabilir (92). İnfluenza ve sendai virus enfeksiyonları süresince nitrativ stres aracılı 8-nitroguanozin oluşumu, patojenik sürece katkısı olan redoks aktivitesi ve mutajenik potansiyel gibi özgün farmakolojik ve biyokimyasal etkilere yol açar (95).

Santral sinir sisteminin nörotropik virus enfeksiyonuna inflamatuar cevabı, büyük olasılıkla kan-beyin bariyerindeki peroksinitrit veya peroksinitrit ürünlerinin aktivitesine bağlıdır (89). Farelerde virulan coxsackie virus enfeksiyonu iNOS ve peroksinitrit oluşumunu artırır ve inflamatuvar miyokardiyal hastalık oluşturur (89). Akciğerlerde adenovirus enfeksiyonu iNOS ve peroksinitrit oluşumunu artırarak nitrotirozin oluşumuna neden olur ve inflamatuvar yanıta katkıda bulunabilir (96). Hepatit C virus (HCV) enfeksiyonu viral kor ve NS3 proteinleri aracılığıyla iNOS geni aktivasyonu yoluyla NO üretimini stimule edebilir. NO, DNA kırıklarına ve DNA mutasyonlarının artmasına neden olur. Bu olaylar dizisi HCV patogenezi ve onkogenezinde bir mekanizmayı ortaya koyar (97). HCV ile enfekte edilen kültür makrofajlarında HCV'nin IL-12, NO ve IFN-γ salınımını azalttığını, TNF-α'yı ise değiştirmediğini göstermişlerdir (98). Dışarıdan APC'lere eklenen rekombinant kor proteini NO üretimini azaltır; fakat TNF-α'yı etkilemez. Beraber ele alınınca, HCV kor proteinin IL-12 ve NO üretimini inhibisyon yoluyla Th1 immunite indüksiyonunu suprese edebildiğini iddia etmişlerdir (98).

Diğer taraftan artmış oksidatif stres viral enfeksiyonların patogenezine dahil olabilir. HIV ile enfekte olan hastalarda enfekte olmayan bireylere kıyasla daha yüksek oranda oksidatif stres, endotelyal disfonksiyon ve kardiyovasküler hastalık insidansı saptanır. Son yayınlarda HIV-1'li hastalarda artmış kardiyovasküler riske katkısı olabilecek olan ROS'un viral proteinler tarafından upregüle edildiği ortaya konulmuştur. HIV-1 transgenik rat modeli kullanılarak HIV-1 protein ekspresyonunun NO'i azalttığı ve endotelyal disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir (99).



Şekil 13. NO'in viruslar üzerine etkileri

NO biyoyararlanımını azaltan ve peroksinitrit oluşumunu düzenleyen azalmış antioksidan kapasitesi vasküler superoksit seviyelerini artırır. Glutatyon seviyelerinin eski haline dönmesi, superoksit, NO ve vazorelaksasyon üzerine HIV-1 protein aracılı etkileri tersine çevirir (99). Junin virus ile indüklenen deneysel fare ansefaliti astrosit reaksiyonu beraberinde belirlenemeyen hücreler tarafından iNOS ekspresyonunu artırır. iNOS'ın spesifik inhibisyonu daha yüksek mortalite; fakat daha az astrositozis ile ilişkilidir. Bu durum NO'in koruyucu rolünün artmış astrosit aktivasyonu ile ilişkisini, virus tarafından indüklenen santral sinir sistemi hasarına karşı faydalı hücresel yanıt oluşumunu desteklemektedir (100).

3.6.6. Viral kanamalı ateşte NO'in rolü

Viral kanamalı ateş ile NO ilişkisi, Ebola Kanamalı Ateşinde (101-103), Hanta virus enfeksiyonlarında (93, 104-106), Dengue virus (DV) enfeksiyonlarında (107-114) ve KKKA'inde (115, 116) çalışılmıştır. Ebola kanamlı ateşinde, NO seviyeleri, yüksek bulunmuş ve mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (101, 102). Hantavirus enfeksiyonlarında HTNV-enfekte hücrelerin, IFN-gama ve IL-1 beta ile uyarılmış enfekte olmamış hücrelere nazaran daha az NO ürettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada Hantavirus ile enfekte hücrelerin IFN-γ ve IL-1'e cevap vermediğini tespit edilmiştir (104). Yapılan çalışmalarda Dengue ateşi

(DF)'inde NO seviyelerinde artış olduğu gösterilmiş; ancak hemorajik dengue ateşi (DHF)' li hastalarda NO seviyeleri sağlıklı kontrol grubu ile benzer bulunmuştur (107). DF'li hastalarda, bir savunma olarak, viral yükün düşürülmesinde NO'in görev aldığı öne sürülmüştür (90). Bir diğer çalşmada ise DV'ların bir kısmının NO duyarlı ve bazılarının ise NO dirençli olduğu ileri sürülmüş ve NO duyarlı DV ile oluşan enfeksiyonların daha hafif seyrettiği, NO dirençli DV ile oluşan enfeksiyonlarda daha fazla viral yük ve daha şiddetli hastalık tablosu ortaya çıktığı tespit edilmiştir (108, 109).

KKKA'inde NO düzeyleri ile ilgili dünyada yapılan tek çalışma ülkemizden Tütüncü ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada KKKA hastalarında NO düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş. Fatal ve nonfatal hasta grupları karşılaştırıldığında ise fatal grupta NO düzeylerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir (115).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hasta seçimi

Çalışmaya Mart 2009-Ağustos 2010 döneminde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniğinde yatarak takip edilen KKKA tanısı almış 60 hasta alındı. Hastalar, Swanepoel kriterleri (3) ile Ergönül ve arkadaşlarının önerdiği modifiye kriterlere (55) göre ve ayrıca klinik olarak kötü prognoz kriterleri (50, 56) göz önünde bulundurularak hafif-orta ve ağır olmak üzere iki gruba ayrıldı.

4.2. Hasta Verileri

Hastalara ait çeşitli bilgiler (epidemiyolojik, demografik, klinik, laboratuvar vs.), hastanın dosyasından hastaneye yatışındaki ve daha sonraki takiplerindeki kayıtlardan alınarak önceden hazırlanan formlara (Ek 1) kaydedildi.

4.3. Çalışmanın Yöntemi

Hastaların kanları gönüllülük esasına göre alındı ve gönüllü bilgilendirme formu okunarak hasta ya da yakını tarafından onam formu imzalatıldı (Ek 2). Hastanın hastaneye yatışından hemen sonra uygun bir periferik venden 5 ml kan alındı, 30 dakika bekletildikten sonra 2000 devir/dk'da 5 dakika santrifüj edilerek serum örneği ayrıştırıldı. İki ayrı ependorf tüpünden birine 1 ml, diğerine 2 ml serum örneği konuldu. Tüm hastaların serum örnekleri referans laboratuar olan Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı viroloji laboratuarına uygun taşıma usullerince Erzurum İl Sağlık Müdürlüğü aracılığıyla test edilmek üzere gönderildi. Çalışmaya alınan hastalar bu referans laboratuarca yapılan testler neticesinde spesifik IgM antikoru pozitif olan ya da PCR ile serumlarında KKKAV varlığı doğrulanmış hastalardı. Çalışmaya kontrol grubu olarak toplam 30 sağlıklı gönüllü katıldı. Hastaların ve kontrol grubu bireylerin serumları (1 ml'lik tüplerdeki) çalışma yapılıncaya kadar -70 °C'de saklandı. Serumlar çalışma günü +5 derecede buzdolabında eritilerek çalışmaya alındı.

4.4. Nitrik Oksit (NO) Ölçümü

NO, atmosferik basınç altında ve oda sıcaklığında gaz halinde bir serbest radikal olduğu için doğrudan ölçülemez. Bu nedenle çalışmada NO konsantrasyonu tayini için onun stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrat ölçümleri kullanıldı.

Nitrat + nitrit konsantrasyonunun belirlenmesinde, öncelikle ortamdaki nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite redüklenmekte ve toplam nitrit ölçümü yapılmaktadır. Nitrit ölçümü Griess reaksiyonuna (117) dayanan spektrofotometrik bir ölçümdür. Griess reaktifinde bulunan fosforik asit (H_3PO_4) ile nitrit reaksiyona girer ve nitröz asit meydana gelir. Nitröz asit sulfonamid ile reaksiyona girerek diazobenzosulfonik asiti oluşturur. Bu bileşik, ortamda bulunan naphtyletilendiamin dehidroklorid ile koyu pembe renkli bir bileşik (azo bileşiği) verir. Bu bileşiğin renk şiddeti spektrofotometrede ölçülmektedir (118).

4.4.1. Nitrik oksit (NO) ölçümü için gerekli çözeltiler

Ölçüm için öncelikle reaktifler hazırlandı. Hazırlanan reaktifler:

1- $ZnSO_4$= 30 gr/100 mL: 30 gr $ZnSO_4$ bir miktar distile suda çözülerek son hacim 100 mL' ye tamamlandı.

2- Griess reaktifi = 0,5 gr sulfonamide + 12,5 gr meta-fosforik asit + 0,050 gr N-1-Naphtyletilendiamin dehidroklorid bir miktar distile suda çözülerek son hacim 500 mL' ye tamamlandı.

3- NADPH+FADH + bir kutu nitrat redüktaz karışımı = 100 numune için: 50 mL distile su içinde 0,004 gr NADPH + 0,0004 gr FAD çözüldü. Bu sıvı pipetle çekildi ve bir kutu Nitrat Redüktaz şişesine boşaltıldı. Karışım tekrar çekildi ve tekrar aynı şişeye boşaltıldı.

NADPH= 50 µmol/L

FAD= 5 µmol/L

Nitrat redüktaz= 200 U/L

4- Sodyum piruvat = 10 mM (Deney ortamında son hacimde): Piruvik asit sodyum tuzundan 1,1 gr alınarak 10 mL distile suda çözüldü.

5- Meta-Fosforik asit = 25 gr/L: Numune körü olarak Griess reaktifi yerine kullanılmak üzere hazırlandı ve 2,5 gr meta-fosforik asit 100 mL distile su içinde çözüldü.

6- Sodyum nitrit ($NaNO_2$) = standart olarak 0-200 µmol/L olacak şekilde hazırlandı. 0,690 gr sodyum nitrit alındı ve 100 mL distile suda çözüldü. Bundan 20 µL alarak üzerine 9990 20 µL distile su eklendi. Böylece 200 µM konsantrasyon elde edildi.

7- Potasyum nitrat (KNO_3) = 1, 011 gr KNO_3, 100 mL distile suda çözüldü. Bundan 20 µL alarak üzerine 9990 20 µL distile su eklendi. Böylece 200 µM konsantrasyon elde edildi.

4.4.2. NO değerlerinin saptanması

1- 100 µL serum + 400 µL bidistile su ependorf tüplere pipetlenerek vortekslendi.

2- Üzerine 500 µL NADPH+FAD+Nitrat Redüktaz karışımı tüplere pipetlenerek vortekslendi.

3- Karanlıkta 37 °C 'de 20 dakika inkübe edildi ve nitratın nitrite dönüşümü sağlandı.

4- 1/20 oranında deproteinizasyon işlemi için inkübe edilen numune karışımına 50 µL $ZnSO_4$ pipetlendi.

5- 1000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi.

6- Üst fazdan 125 µL mikroplate kuyucuklarına konarak üzerine 125 µL Griess reaktifi eklendi. Ayrıca her numune için numune körü alındı. Bunun için Griess reaktifi yerine hazırlanan meta-fosforik asit konuldu. Böylece her numune için back grond değerleri alınmış oldu. Mikroplate nazikçe karıştırıldı.

7- Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra 540 nm dalga boyunda ELISA mikroplate reader'de okutuldu.

8- Standart grafik için 0-100 µmol/L aralığında konsantrasyonu olacak şekilde sodyum nitrik standart olarak hazırlandı. Sodyum nitrit 100 µmol/L olarak hazırlandı. Ayrıca seri dilüsyonlarla 0 - 1, 56 - 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25- 50 - 100 ve 200 µmol/L olacak şekilde standartlar hazırlandı.

Her bir numune için ELISA mikroplate reader'den elde edilen değerler katsayılarla hesaplanarak NO değerleri elde edildi. Bu metodun tespit edebildiği en düşük NO konsantrasyonu (saptama limiti) 1,5 µmol/l idi.

Hastaların serum NO düzeyleri;

- Yaşa göre
- Cinsiyete göre
- Ölen ve yaşayan hastalar arasında
- Semptomların başladığı günden çalışma kanı alınıncaya kadar geçen süreye göre
  - Grup 1: 1-3 gün
  - Grup 2: 4-7 gün
- Ağır ve hafif-orta grup hastalar arasında
- Hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasında
- Ağır ve hafif-orta seyreden hastalarla kontrol grubu arasında

- ❖ Ağır seyreden hastalarla kontrol grubu arasında
- ❖ Ölen ve yaşayan hastalarla kontrol grubu arasında
- ❖ Laboratuar olarak;
  - ▪ ALT, AST, CK, LDH seviyeleri arasında
  - ▪ PT, PTT, INR düzeyleri arasında
  - ▪ WBC, PLT miktarları arasında
- ❖ Klinik olarak
  - ▪ Kanama varlığı ile
  - ▪ Şuur değişikliği olmasıyla
  - ▪ Pozitif akciğer muayene bulgularının varlığı ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

4.5. İstatistiksel Analiz

Veriler sayı, yüzde, ortalama ve standart sapma olarak verildi. Verilerin analizinde SPSS 19 bilgisayar programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Simirnov testi ile analiz edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda, bağımsız gruplarda t testi, Mann-Whitney U, kategorik verilerin analizi ki-kare, NO ile ALT, AST, CK, LDH, PT, PTT, INR, WBC, PLT değişkenleri arasında pearson korelasyon analiz testleri kullanıldı. $P < 0.05$ olması durumunda H1 hipotezi kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Demografik ve Epidemiyolojik Bulgular

Çalışma toplam 60 hasta üzerinde yapıldı. Bu hastaların 34 tanesi (% 56.6) erkek, 26 tanesi (%43.3) kadındı. Sağlıklı kontrol grubu 30 kişiden oluşuyordu. Kontrol grubununda 17 (%56,6) erkek, 13 (%43.3) kadın yer alıyordu (Tablo 5). Hastaların yaş ortalaması 50,48±16,851 idi. Ağırlık kriterlerine göre hastaların 18'i (% 30) ağır, 42'si (% 70) hafif-orta gruba dahildi. Çalışmaya alınan toplam 60 hastanın 6 tanesi (%10) öldü. Hastalardan birisinde ölüm sebebi atrial fibrilasyondan idi. Bir diğer hastada ise ani şuur kaybı ve hemen arkasından kardiyopulmoner arrest gelişti ve ölüm nedeni intrakranial kanama olabileceği düşünüldü. Ellidört (% 90) hasta şifa ile taburcu edildi.

Tablo 5. Hasta ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet durumları

Grup	Cinsiyet		Yaş Ortalama (Sınır değerler)
Hasta n: 60	Kadın	26	49 ± 16,8 (18 – 83)
	Erkek	34	52 ± 17 (18 – 82)
Kontrol n: 30	Kadın	13	48 ± 15,5 (19 – 70)
	Erkek	17	50,8 ± 16 (28 – 78)

Hastaların toplam 45'inde (%75) kene temas öyküsü mevcuttu. Diğer 15 hastanın (% 25) kene teması yoktu. Temas hikayesi bilinen hastalarda ortalama kuluçka süresi 3,7 gün (1 – 10 gün)' dü. Hastalardan alınan çalışma kanı, semptomların başlamasından ortalama olarak 3,2 ± 1,5 gün (1-7 gün) sonrasına tekabül ediyordu.

Hastaların tamamı kırsal alanda yaşıyordu ya da kırsal alana ziyaret öyküsü mevcuttu. Hastalardan 29'u çiftçilikle uğraşırken, 18'si ev hanımı (bunlardan 11'i aynı zamanda çiftçilik ve 7'si de hayvancılıkla uğraşıyor), 7'si hayvan bakıcısı, 1 tanesi öğrenci, 5 tanesi de diğer meslek gruplarındandı. Hastaların demografik özellikleri Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. KKKA hastalarının demografik özellikleri

		n (%)	
Kene öyküsü	var	25 (%75)	
	yok	15 (% 25)	
Meslek			
Çiftçi		29 (% 48)	
Ev hanımı- çiftçi		11 (% 18)	
Ev hanımı - hayvancılık		7 (% 12)	
Hayvan bakıcısı		7 (% 12)	
Öğrenci		1 (% 1.6)	
Diğer		5 (% 8.3)	
Ortalama inkübasyon süresi		3,7 ± 1,5 gün	(1 -7)

5.2. Semptomlar

Hastalarda en sık semptomlar ateş (% 96.6), halsizlik (% 95) ve iştahsızlık (% 80) idi. Toplam 13 hastada (% 21.6) yatışlarında ya da daha sonraki takiplerinde kanama görüldü ve en sık diş eti (% 8.3) ve burun kanaması (% 8.3) gözlendi. Bir hastada (% 1.6) yatışında melana şikayeti mevcuttu. Hastaların semptomları Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7. KKKA tanısı ile takip edilen hastaların semptomları

Semptom	n	%
Ateş	58	96.6
Halsizlik	57	95
İştahsızlık	48	80
Yaygın vücut ağrısı	42	70
Baş ağrısı	39	65
Bulantı	29	48.3
Kusma	26	43.3
İshal	15	25
Kanama	13	21.6
Karın ağrısı	11	18.3
Öksürük	9	15
Cilt döküntüsü	8	13.3
Şuur değişikliği	7	11.6

5.3. Fizik Muayene Bulguları

Hastalarda en sık saptanan fizik muyene bulguları fasiyal hiperemi (% 61.6), orofarenkste mukozasında hiperemi (% 55) ve konjunktival hiperemi (% 38.3) idi. Hastaların takipleri esnasında 6 hastada şiddetli kanama (% 10) gelişti. Bu hastalardan 4'ü öldü, ikisi şifa ile taburcu edildi. Bir hastada rektus kası içine kanama (% 1.6), bir hastada da hemartroz (% 1.6) görüldü. Radyolojik olarak hastalardan birinde panbronşiolit (% 1.6) ve ölen hastalardan ikisinde yaygın pnömonik infiltrasyon (% 3.3) vardı. Üç hastada (% 5) bradikardi görüldü ve bu üç hasta da şifa ile taburcu edildi. Bir hastada (%1.6) atrial fibrilasyon gelişti ve bu hasta kaybedildi. Hastalara ait fizik muyene bulguları Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 8. KKKA olgularının fizik muyene bulguları

Bulgu	n	%
Fasiyal hiperemi	37	61.6
Orofarenkste hiperemi	33	55
Konjunktival hiperemi	23	38.3
Hepatomegali	21	35
Akciğer dinleme bulgusu*	19	31.6
Splenomegali	14	23.3
LAP	9	15
Makülopapuler döküntü	5	8.3
Kardiak bulgular**	4	6.6
Peteşi, purpura, ekimoz	3	5
Oral kandidiasis	1	1.6
Herpes labialis	1	1.6
Hemartroz	1	1.6

*Ral, ronküs, whezing **Bradikardi, aritmi

5.4. Laboratuvar Bulguları

Hastaların laboratuvar bulguları, hastaneye yatışlarında, NO çalışma kanı ile eş zamanlı alınan kandan çalışılan laboratuvar değerleri esas alınarak yazıldı ve gruplandırma (hafif-orta, ağır hasta grubu) bu laboratuvar değerleri ile klinik olarak kötü prognoz kriterleri esas alınarak yapıldı. Laboratuvar parametrelerinden WBC, PLT, AST, ALT, CPK, LDH, PT, PTT ve INR değerleri çalışmada kullanıldı. Hastalara ait laboratuvar bulguları Tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9. Fatal ve nonfatal seyreden hastalara ait çeşitli laboratuvar bulguları

	Ölen Grup n=6 Ortalama standart sapma (range)	**Sağ Kalan Grup n=54 Ortalama standart sapma (range)**
WBC	4640 ± 2880 (2700 – 9900)	2278 ± 1003 (770 - 6300)
PLT	26500 ± 23450 (13000 –73000)	68130 ± 34861 (1200 - 151000)
AST	802 ± 1112 (57 - 3000)	217 ± 345 (27 - 2413)
ALT	253 ± 319 (27 - 870)	105 ± 118 (16 - 605)
CPK	912 ± 550 (229 - 1853)	634 ± 659 (34 - 2408)
LDH	2187 ± 2340 (384 - 6496)	582 ± 467 (199 - 3186)
PT	17, 3 ± 2, 08 (15 - 19, 6)	14,4 ± 1, 81 (11 - 19, 4)
PTT	44, 7 ± 5, 6 (38, 6 - 52, 2)	34,6 ± 5, 0 (21, 9 - 50, 7)
INR	1, 58 ± 0, 27 (1, 22 - 1, 9)	1,14 ± 1, 18 (0, 86 - 1, 68)

5.5. Serum NO Seviyeleri

KKKA tanısı almış toplam 60 hastanın kanında serum NO seviyeleri çalışıldı. Çalışmaya alınan hastalardan birinde NO seviyesi oldukça yüksek çıktı. Bu hasta çalışmadan çıkarıldı.

5.5.a. Yaş, cinsiyet, sonuç (ölenler ve yaşayanlar), seyir (ağır, hafif-orta) ve semptomların başlamasından çalışma kanı alınmasına kadar geçen süre (1-3 gün, 4-7 gün)'ye göre serum NO düzeylerinin hastalar arasındaki karşılaştırılması

Hastaların yaşlarıyla NO değeri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (p=0,749). Cinsiyet, hastalığın sonucu (ölen ve sağ kalan), hastalığın seyrine göre (ağır ve hafif-orta) ve semptomların başlamasından çalışma kanı alınmasına kadar geçen süreye (1-3 gün, 4-7 gün) göre yapılan sınıflandırmada hastaların serum NO değerleri Tablo 10'da gösterildi. Hastalar arasında bu özelikler ile NO değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu (Tablo 10).

Tablo 10. Hastaların cinsiyet, klinik seyir ve çalışma gününe göre NO değerlerinin karşılaştırılması

		n	NO (µmol/L) ortalama	p
Cinsiyet	Kadın	25	22, 3 ± 16, 7	
	Erkek	34	17, 6 ± 14, 95	0, 245
Sonuç	Ölen	6	20, 2 ± 20, 6	
	Sağ	53	19, 5 ± 15, 3	0, 791
Klinik seyir	Ağır	17	20, 3 ± 17, 95	
	Hafif	42	19, 3 ± 15	0, 993
Çalışma	1-3 gün	37	20,3 ± 14, 9	0, 634
kanı günü	4-7-gün	22	18,3 ± 17, 4	0, 648

5.5.b. Hastaların bazı klinik özelliklerine göre serum NO seviyelerinin karşılaştırılması

Klinik olarak, hastalardan kanaması olanlarla olamayanlar (p=0,551), akciğer dinleme bulgusu mevcut olanlarla olmayanlar (p=0,949) ve şuur değişikliği bulunanlarla bulunmayanlar (p=0,818) arasında serum NO düzeylerinin karşılaştırılması yapıldı ve aralarında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

5.5.c. Hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasında serum NO seviyelerinin karşılaştırılması

Hastalarla kontrol grubunun serum NO düzeylerinin karşılaştırılmasında ise, ortalama NO düzeyleri hasta grubunda 19,56 ± 15,73 µmol/L, kontrol grubunda 29,9 ± 16,573 µmol/L olup kontrol grubunda hastalardan anlamlı oranda yüksekti (p=0,006) (Tablo 11).

Tablo 11. Hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki NO değerlerinin karşılaştırılması

	Hasta n=59	**Konrol Grubu n=30**	**p**
NO (µmol/L)	19, 56 ± 15, 73	29, 9 ± 16, 5	0, 006

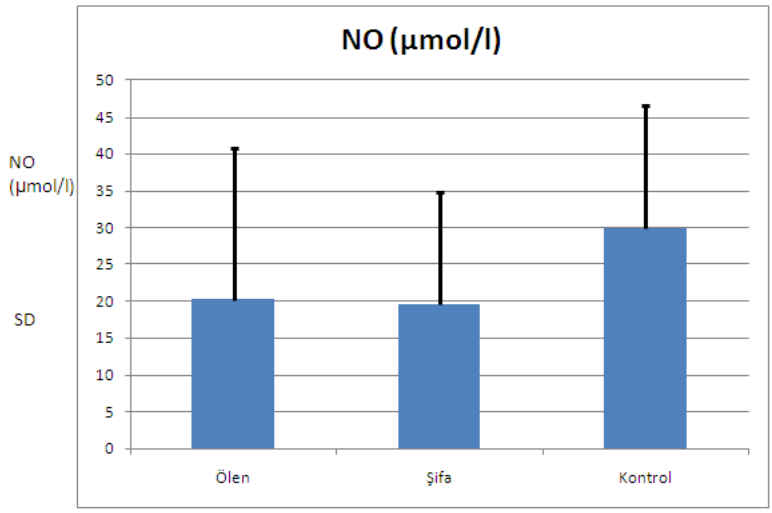
Ölen ve sağ kalan hastaların serum NO düzeyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında; ortalama NO değeri ölen hasta grubunda 20, 2 ± 20, 6 µmol/L, sağ kalan hasta grubunda 19, 5 ± 15, 3 µmol/L idi. Ölen grupta çok hafif bir yükseklik olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca ölen hasta grubu ve sağ kalan hasta grubu, sağlıklı

kontrol grubu ile NO değerleri yönünden ayrı ayrı karşılaştırıldı. Ortalama NO değeri kontrol grubunda 29, 9 ± 16,5 µmol/L ile hem ölen hem de sağ kalan hasta grubundan yüksek çıktı. Ancak aradaki fark, sağlıklı kontrol grubu ile ölen hasta grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamsızdı (p = 0,126). Bununla beraber sağ kalan hasta grubu ile kontrol grubu NO değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu (p = 0,007). Sonuçlar Tablo 12'de gösterildi.

Tablo 12. Ölen ve sağ kalan hastaların serum NO seviyeleri ile kontrol grubu NO değerlerinin ile karşılaştırılması

	Hasta			**Kontrol Grubu**		
	Sağ n:53	**Ölen n:6**	**p**	**n:30**	**p1**	**p2**
NO (µmol/L)	19, 5 ± 15, 3	20, 2 ± 20, 6	0, 791	29, 9 ± 16,5	0, 007	0, 126

p: Ölen hastalarla sağ kalan hastalar arasındaki NO p değeri
p1: Sağ kalanlarla kontrol grubu arasındaki p değeri
p2: Ölen hastalarla kontrol grubu arasındaki NO p değeri



Şekil 14. Ölen, şifa ile taburcu edilen ve kontrol grubu hastaların serum NO seviyeleri

Hastalığın seyrine göre, hafif-orta grupta serum NO düzeyi 19, 3 ± 15 µmol/L iken ağır hastalarda serum NO düzeyi ise 20,3±17,95 µmol/l olup fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (p=0,093). Kontrol grubun serum NO değeri ise 29,9 ± 16,52 µmol/L ile bu her iki gruptan anlamlı derecede yüksekti (Ağır seyreden hastalarla kıyaslandığında p=0,047, hafif-orta seyreden hastalarla kıyaslandığında p=0,009) (Tablo 13).

Tablo 13. Klinik şiddete göre hasta gruplarının ve kontrol grubunun NO değerlerinin karşılaştırılması

	Hastalığın seyri			**Kontrol grubu**		
	Ağır	Hafif-orta	p		p1	p2
n	17	42		30		
NO µ/mol/l	20, 3 ± 17,95	19, 3 ± 15	0, 993	29,9 ± 16, 52	0, 047	0, 009

p: Ağır ve hafif-orta seyreden hasta grubu arasında NO p değeri
p1: Ağır seyreden hastalarla kontrol grubu arasında NO p değeri
p2: Hafif-orta seyreden hastalarla kontrol grubu arasında NO p değeri

5.5.d. Hastaların eş zamanlı çalışılan laboratuvar bulgularının serum NO düzeyleri ile karşılaştırılması

Hastaların çalışma kanıyla eş zamanlı alınıp çalışılan kandaki bazı laboratuvar parametreleri (WBC, PLT, AST, ALT, CK, LDH, PT, PTT, INR)'ne ait bulgular ile serum NO düzeyleri arasında karşılaştırılma yapıldı. Her biri için yapılan ayrı ayrı karşılaştırma Tablo 14'de gösterildi. Sadece LDH yüksekliği ile NO değeri arasında anlamlı bir ilişki vardı (p=0,017).

Tablo 14. Hastaların eş zamanlı çalışılan laboratuar bulgularının serum NO düzeyleri ile korelasyonu

Parametre	**Ortalama**	**NO**	
		Pearson korelasyon	**p**
WBC	2514, 5 ± 1455, 4 (770 - 9900)	0, 151	0, 255
PLT	63966, 67 ± 36012, 7 (12000 – 151000)	-0,105	0,429
AST	275, 17 ± 492, 8 (27 - 3000)	0, 143	0, 278
ALT	120, 17 ± 152, 4 (16 - 870)	0, 106	0, 423
CK	662, 12 ± 654 (34 - 2804)	0, 032	0, 81
LDH	742, 58 ± 946, 6 (199 - 6496)	0, 309	0, 017
PT	14, 688 ± 2 (11 - 19, 6)	-0, 122	0, 359
PTT	35, 63 ± 6, 7 (21, 9 - 52, 2)	0, 163	0, 216
INR	1, 1857 ± 0, 2 (0, 86 - 1, 9)	-0, 106	0, 426

6. TARTIŞMA

KKKA hastalığının patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Ancak diğer kanamalı ateşlere benzer olduğu düşünülmektedir. Bu konuda giderek artan sayıda çalışma yapılmaktadır.

Ana hedefin mononükleer hücreler, hepatositler ve endotel olduğu bilinmektedir. Viral yayılım sonucu doku ve organlarda başta mononükleer hücreler ve nötrofillerin ağırlıklı olduğu enflamasyona yol açar (26). Makrofaj ve endotel hücrelerinin aktive olmasıyla sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) gelişebilir (26).

KKKA patogenezde en önemli basamak endotelin etkilenmesidir ki doğrudan virusun etkisinden ziyade virusa karşı salınan inflamatuvar faktörlerin etkisiyle endotel hasarı oluştuğu anlaşılmıştır (26). Endotel hasarı ise intrensek koagulasyon kaskadını trombosit adezyonu, agregasyonu ve degranülasyonu yoluyla aktive ederek hemostatik yetmezliğe neden olur. Sonuçta DIC ve yaygın kanamalar meydana gelir. DIC, KKKA'nde koagulasyon faktörlerinin plazmada aşırı tüketimi sonucu görülen bir durumdur (30). Ayrıca hastalıkta plazma koagülasyon faktörlerinin sentezi azalır, çünkü bu faktörlerin birçoğunun sentez yeri olan karaciğerin fonksiyonları da viral sitopatik etkiyle bozulmaktadır (30, 28). Çalışma süresince izlediğimiz 60 hastanın takipleri esnasında 6 hastada (%10) DIC'e bağlı şiddetli kanama gelişmiş bunların 4'ü (% 6.6) fatal sonuçlanmış, ikisi şifa ile taburcu edilmiştir. Hastalık esnasında ortaya çıkan immünkompleksler de komplemanı aktive ederek hem endotel hasarına yol açar, hem de bazofiller, mast hücreleri ve trombositlerden vazoaktif aminlerin salınmasını sağlarlar. Ayrıca, C5a monositlerden TNF-α, IL-1, IL-6 ve IL-8 salgılanmasını uyarır. TNF-α ve IL-1'in etkisiyle endotelden, fibrinolizi baskılayan plazminojen aktivatör-inhibitör (PAI) ve intrensek koagulasyon sistemin uyaran doku faktörü serbestleşir. Sonuçta endotel hasarı ve permeabilite artışı ve damariçi pıhtılaşma şiddeti artar (30).

Tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi immün cevap ve özellikle antikor sentezi enfeksiyonun sınırlandırılmasında ve iyileşme sürecinde önemlidir. Nitekim KKKA'nde ağır hastalarda bozulmuş bağışık yanıt söz konusudur (30). Fatal seyreden KKKA vakalarında antikor yanıtının yetersiz olduğu bildirilmekte olup bu vakalarda, inflamatuar mediatörler muhtemelen önemli rol oynamakta ve bu hastalarda şok ile birlikte fulminan seyir gözlenmektedir (27). KKKA'da tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), düzeylerinin arttığı saptanmış; özellikle ölen hastalarda düzeylerinin

daha yüksek olduğu gösterilmiştir (37, 119). IL-6'nın hafif ve orta şiddetteki olgularda da arttığı ve immünpatogenezde önemli bir rolü olduğu; akut faz cevabından ve ateşten sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır (25, 37). TNF-α hemofagositozla sonuçlanabilen makrofaj aktivasyonuna katkıda bulunur.

Genellikle VKA oluşturan viruslar monosit, makrofaj, dendritik hücre, endotelial hücre, hepatosit ve adrenal korteks hücreleri başta olmak üzere birçok hücreyi enfekte etmektedir (28, 29, 30). Hem doğdudan enfekte olan endotel hücleri ve hem de enfekte olmuş monosit ve dentritik hücrelerin salgıladığı TNF-α, interlökin-6 ve interlökin-8 gibi sitokinler endotel hücrelerinde ICAM-1 ve VCAM-1 expreyonunda artışa neden olur. Bu da lökosit adezyonunu artırır (36).

KKKA'nde, diğer tüm VKA'lerde olduğu gibi trombositopeni görülür. Ölümle sonlanan olgularda, hastalığın erken döneminden itibaren ciddi trombositopeni vardır (5). KKKA'nde kemik iliği tablosu değişken olup yapılan incelemelerde kemik iliğinde hemofagositoz ve hipoplazi gözlenmiştir (9, 30). Ayrıca, endotel hasarının trombosit yıkımını arttırarak trombositopeniye katkıda bulunabileceği düşünülmekedir (31). Çalışmaya aldığımız 60 hastanın tamamında trombositopeni mevcuttu ve ağır seyreden hasta grubunda erken dönemden itibaren ciddi trombositopeni vardı.

Endotel hasarı klinikte döküntüyle kendini gösterebilir (32). KKKA'nde makülopapüler döküntülerden, peteşi, purpura, ekimoza varıncaya kadar her türlü döküntü görülebilir (120). Bizim çalışmamızda 8 hastada (% 13.3) cilt döküntüleri mevcuttu.

Hastalıktan ölenlerde şok, intraabdominal kanama, serebral kanama, ciddi anemi, dehidratasyon, miyokard infarktüsü, akciğer ödemi ve plevral effüzyon görülmektedir (5). Ayrıca ölen hastaların karaciğer hücrelerinde çeşitli derecelerde nekroz, yağlanma ve portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu, fagosite edilmiş hücre artıklarını içeren hipertrofik ve hiperplastik Kupffer hücreleri, sinüzoidal dilatasyon ve safra stazı vardır. Karaciğerde nekroz fokal veya lobüller olabilir. Nekroz alanlarında kanama, hücre kaybı, eozinofilik değişiklikler ve Councilman cisimciği görülür. Mononükleer hücre infiltrasyonu hepatosellüler hasarın yoğun olduğu alanlarda değil, daha çok hasarın az olduğu alanlarda saptanmıştır. İnfekte ve hasarlı hepatositlerde anlamlı bir inflamatuvar cevabın olmayışı, hasarın virusun direkt sitopatik etkisiyle oluştuğunu göstermektedir (27). Virus hem hayvanlarda hem de insanlarda karaciğerde hepatositler ile Kupffer hücrelerinde gösterilmiştir (33). Karaciğerdeki hasara bağlı olarak serum tarnsaminazlarında ileri derecede yükseklikler

görülür (29). Bizim çalışmamızda ölen hastaların ortalama ALT ve AST değerleri sağ kalanlara göre anlamlı oranda yüksekti.

Virus ilişkili hemofagositik sendrom KKKA'nde sık görülür. Bu nedenle takipte anemi sıklıkla gelişir. Dilber ve arkadaşları 21 çocuk hastayla yaptıkları çalışmada, hastaların yaklaşık %30'unda hemofagositozla uyumlu bulgular saptamıştır (34). Ülkemizde 2007 yılında yapılan bir çalışmada, KKKA tanısı alan 3'ü çocuk toplam 5 hastanın kemik iliği incelemesinde hemofagositoz saptanmıştır (35). Yine ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada 14 hastanın 7'sinde (%50) reaktif hemofagositoz tespit edilmiştir (9). Bu çalışmalar, KKKA enfeksiyonu sırasında gözlenen sitopenide hemafagositozun rolü olabileceğini düşündürmüştür. Çünkü hemofagositik lenfohistiyositosis, belirgin artmış monosit aktivasyonuna ve Th1 sitokin yüksekliğine (interferon gama, tümör nekrozis faktör alfa, interlökin 1 ya da interlökin 6) bağlıdır.

NO'in vücutta, vazodilatasyondan, trombosit agregasyonuna, infeksiyonla ve tümör hücreleri ile savaşa, inflamasyon mediatörlüğünden ve makrofaj sitotoksik aktivitesine, sinir hücreleri arasında sinyal iletimine kadar geniş bir görev alanı vardır (57). Vazodilatatör etki ile damar resistansının düzenlenmesi (66), trombosit aktivasyonunun önlenmesi, endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılması ve miyokard kontraktilitesinin düzenlenmesinde önemli işlevleri vardır (67). NO, hem doku koruyucu hem de zarar verici olabilir. İnflamasyonda doza bağlı olarak etkileri değişir. Uygun konsantrasyonlarda antiinflamatuvar etkili olup; in-vitro olarak nötrofil agregasyonunu azaltıp, lizozomal enzim salınımını ve CD11/CD18' i inhibe ederek lökositlerin damar duvarına adezyonunu azalttığı gösterilmiş ve antiinflamatuvar etkinliği bu şekilde ortaya konulmuştur (60). Aşırı sentezi inflamasyonu artırır ve konakta doku hasarı yapar.

KKKAV ile NO ilişkisi ilk kez Simon ve ark. (116) tarafından araştırılmış; bu çalışmada NO'in in-vitro olarak KKKAV'nun replikasyonuna karşı önemli işleve sahip olduğu tespit edilmiştir. NO donörü S-Nitrozo-N-Asetilamin verilerek viral proteinlerin ve viral RNA'nın önemli oranda azaldığını ve sonuçta KKKAV'nun replikasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir.

KKKA hastalarında NO düzeyleri ile ilgili dünyada yapılan tek çalışma ülkemizden Tütüncü ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada KKKA hastalarında NO düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek (hasta grubunda: 40,49±23,0 ve kontrol grubunda: 14,89±7,94 μmol/L) bulunmuşlardır. Ölen ve sağ kalan

hasta grupları karşılaştırıldığında ise ölen grupta NO düzeylerinin anlamlı oranda daha düşük olduğu tespit edilmiştir (sağ kalan grupta: 43,57±22,7 ve ölen grupta: 26,23±19, 43 µmol/L) (115). Bu çalışmada Tütüncü ve arkadaşları NO'in immun sistemin viral enfeksiyonlarda güçlü bir savunma elemanı olduğunu sağ kalan hastalarda yüksek miktarda NO sentezlendiği için muhtemelen viral replikasyonun baskılandığını, ölen hastalarda ise yeterli immun savunma olmadığı için NO'in de düşük olduğu, bundan dolayı da hastaların ölmüş olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda Tütüncü ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak KKKA hastalarında serum NO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulundu (ortalama NO düzeyleri, hasta grubunda: 19,56±15,73 µmol/L, kontrol grubunda: 29,9±16,573 µmol/L). NO yaş, cinsiyet vb. demografik özelliklerden herhangi bir şekilde etkilenmiyordu. Klinik seyirle ilişkisini araştırdığımızda ise hastaların hem klinik hem laboratuvar olarak ağırlık kriterlerine göre değerlendirildiğinde; ağır hastalar ile orta seyirli hastalar arasında, ayrıca ölen ve sağ kalan gruplar arasında NO değeri açısından fark saptanmadı. Laboratuar sonuçları ile NO arasındaki ilişki incelendiğinde ise sadece LDH ile NO değeri arasındaki korelasyon anlamlı bulundu. Sağlıklı kontrol grubu ile ölen hasta grubu karşılaştırıldığında istatistiksel fark saptanmazken sağ kalan hasta grubu ile kontrol grubu NO değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu. Ayrıca yine çalışma sonuçlarımıza göre hastalığın başlangıcından itibaren ilk üç gün içinde başvuran hastalarla 4-7 gün içerisinde hastaneye başvuran hastaların yatışta (ilk gün) alınan serum örneklerinde NO değerleri neredeyse aynı idi.

NO immun hücre aktivasyonunu, proliferasyonunu, sitokin sentezini ve sitokin sinyalini aktive de edebilir, inhibe de edebilir (57, 76, 77). T hücre proliferasyonunu artırdığı gibi T hücre aktivasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. NO aynı zamanda cGMP üzerinden T hücre alt tip yanıtının indüksiyonundan da sorumlu olup negatif feedback mekanizması ile Th 1 hücre büyümesini seçici olarak inhibe eder (83, 90). Ancak düşük konsantrasyonları güçlü bir Th-1 cevabı oluşturulması için gereklidir (90, 116). Bu bilgiler çalışmamızda hasta grubunda saptadığımız düşük NO seviyelerinin gerekli Th 1 hücre cevabını ortaya çıkarabilmek için immün sistem tarafından bir şekilde regüle edilmiş olabileceğini düşündürtmektedir. Sağ kalan hastaların NO seviyeleri kontrol grubuna göre belirgin derecede düşük olduğu halde ölenlerle kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamda farkın olmaması düşük NO seviyelerinin daha iyi bir Th1 cevabının oluşmasını sağlayarak hastalığın prognozunu olumlu etkilemiş olabileceğini düşündürtmektedir. Nitekim düşük NO

düzeylerinin Th 1 hücre cevabı için gerekli iken yüksek düzeyleri negatif feedback mekanizması ile Th 1 hücre büyümesini seçici olarak inhibe edebilmektedir (109). Bu bilgilerin ışığında ölen hastalarda Th1 yanıtının yeterince oluşmamış olabileceğini, bu nedenle klinik seyrin daha kötü olduğunu söylemek mümkündür.

NO'in sitokin sentezi üzerine de çeşitli etkileri vardır. NO, TNF-α, IL-6, IL-12, granülosit koloni stimülan faktör (GCSF) sentezi için gereklidir (79, 90).

Ekzojen NO, insan periferik mononükleer hücrelerinde ve lipolisakkaritle uyarılmış nötrofil preparatlarında TNF-α sentezini artırır (79). Aynı zamanda Rimbach ve arkadaşlarının (121) yaptığı bir çalışmada lipopolisakkarit ile uyarılmış monosit ve makrofajlarda TNF-α ve IFN-γ'nın NO salınımını artıran en önemli sitokinler olduğu gösterilmiştir. Dolaysıyla TNF-α'nın düşük olduğu durumda NO'in de düşük olması beklenir. Nitekim bizim çalışmamızla eş zamanlı olarak aynı hasta grubunun serumlarında çalışılan TNF-α düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (henüz yayınlanmamış çalışma) ki bu sonucun bizim çalışmamızı desteklediğini düşünmekteyiz. Hasta grubunda TNF-α'nın düşük olması NO düzeylerinin de düşük kalmasına yol açmış olabilir; NO yeterince sentezlenemediği için TNF-α da düşük saptanmış olabilir ya da her iki parametrede şimdilik bilemediğimiz başka nedenle yeterli düzeylere ulaşmamış olabilir.

IL-12 ile de NO sentezi karşılıklı birbirini etkilemektedir. IL-12, Th1 hücresel immün cevabın yanısıra T hücre bağımlı veya bağımsız humoral immünitenin güçlü bir uyarıcısı olup; enfeksiyonlar esnasında koruyucu immün cevabın oluşmasında ve aşırı sitokin salınımının önlenmesinde önemli bir immünregülatuar role sahiptir. NO de T hücre cevabının başlaması ve regüle edilmesinde önemli fonksiyonlara sahiptir (Şekil 12). Diefenbach ve arkadaşlarının (80) yaptığı bir çalışmada endojen NO, IL-12 için gerekli olduğu; ekzojen NO'in ise IL-12 üretimini azalttığı gösterilmiştir. Ireland ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada, vesiculer stomatit virus ile farelerde oluşturulan ensefalitte IL-12'nin viruslar üzerine etkisinin NO aracılı olduğunu göstermişlerdir (122). Faqundes ve arkadaşları (123) Dengue virusu ile enfekte farelerde yaptıkları çalışmada IL-12 ve IL-18 seviyelerinin yükselmesinin beraberinde IFN-γ ekspresyonunu artırdığı ve buna bağlı olarak da iNOS artışı olduğunu göstermişlerdir. IL-12 eksik farelerde viral yük artmış ve sonuçta letalite artmıştır (123). iNOS'i baskılanmış farelerde ya da iNOS inhibitörleri ile tedavi edilen normal hayvanlarda IL-6 üretimi ve granülosit koloni stimulan faktör (GCSF) üretimi azalmıştır. iNOS eksik farelerde bazı sitokin sinyallerinde kayıp olduğu görülmüştür. Sonuç olarak iNOS, IL-12

aracılı T-hücre proliferasyonu ve aktivasyonu; ayrıca INFα/β tarafından natural killer (NK) hücre aktivasyonu için gereklidir (80).

Saksida ve arkadaşları çalışmalarında ağır ve fatal seyirli KKKA hastalarında IL-12 düzeylerini düşük bulmuşlardır (37). Bu sonuç bizim çalışmamızı destekler nitelikte olup; hastalıkta IL-12 seviyesinin düşük olmasına bağlı olarak da NO sentezinin yeterince oluşmamış olması mümkündür. Öte yandan düşük NO değerleri IL-12'nin de yeterince sentezlenememesinin sebebi olabilir.

Ding ve arkadaşları (81) makrofajlar tarafından nitrit oksit üretiminde etkisi olan 12 farklı sitokinin etkilerini inceleyerek en etkili olanının IFN-γ olduğunu bulmuşlardır. Proto ve arkadaşları (124) HBV ile enfekte T hücrelerinde IFN-γ verildiğinde 45 kat daha fazla iNOS mRNA üretildiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada NO'in HBV DNA replikasyonunun inhibe edilmesinde tek başına etkili olmadığı; viral çoğalmanın IFN-γ varlığında baskılandığını tespit etmişlerdir (124). H1N1 ve HSV ile enfekte makrofajlarda IFN-γ ile NO artışı gösterilmiştir (125, 126). Jarasch ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada (127), Coxsackievirus B3 (CVB3) ile enfekte edilmiş fare makrofajlarında IFN-γ salınımının iNOS indüksiyonu yaptığı, buna bağlı olarak da NO seviyesinin arttığı ve viral replikasyonun baskılandığı tespit edilmiştir. Faqundes ve arkadaşları (123) Dengue virusu ile enfekte farelerde yaptıkları çalışmada IL-12 ve IL-18 seviyelerinin yükselmesinin beraberinde IFN-γ ekspresyonunu artırdığı ve buna bağlı olarak da iNOS artışı olduğunu gösterdiler. IL-12 eksik farelerde tümden IFN-γ oluşumu durmuş ve viral yük artmış, trombositopeni derinleşmiş, hastalık daha şiddetli seyretmiş ve sonuçta letalite artmıştır. IFN-γ düşünce NO düzeylerinin düştüğü görülmüştür (123). Bütün bu çalışmalar virusa karşı savunmada önemli bir role sahip olan IFN cevabı ile NO düzeyleri ile arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Andersson ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada (128) in vitro olarak KKKA'nde bir kez virusla enfekte olan hücrede IFN cevabının baskılandığını tespit etmişlerdir. KKKA'nde IFN cevabının baskılanması hem viral yayılımın önlenememesine hem de yetersiz NO sentezine neden olabilir.

KKKA'nde IFN cevabının baskılanması, IL-12 cevabının ve NO sentezinin düşük düzeyde oluşu hastalıkta immun sistem cevabının bir şekilde virus tarafından baskılandığının göstergeleridir. Bu sonucu destekler nitelikte bir çalışma da Lee ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (98). Bu çalışmada HCV ile enfekte edilen kültür makrofajlarında virusun IL-12, NO ve IFN-γ salınımını azalttığı gösterilmiştir. Dışarıdan APC'lere eklenen rekombinant kor proteini NO üretimini azaltmıştır. Sonuçta HCV kor proteinin IL-12 ve NO üretimini

inhibisyon yoluyla Th1 immun cevabı baskıladığını ileri sürmüşlerdir. Kronik hepatit C hastalarında kontrol grubuna göre düşük gözlenen IL-12 ve IFN gama'nın azalmasının HCV enfeksiyonun ilerlemesine neden olduğunu iddia etmişlerdir (98).

Konakta iNOS ekspresyonu Th 1-Th 2 şiftine göre değişkenlik gösterebilir. NO eksik farelerde infeksiyon ve antijenik stimulasyon süresince daha fazla interferon ve daha az IL-4 üretimine neden olan artmış Th 1 cevabı gözlenir (90). Bu da NO'in negatif feedback mekanizması ile Th 1 hücre büyümesini seçici olarak inhibe ettiğinin göstergesidir. Aktif makrofajlar tarafından IL-12 sentezinin seçici inhibisyonu kısmen bundan sorumlu olabilir (77). Diğer taraftan enfeksiyonun erken evreleri süresince üretilen düşük konsantrasyonlardaki NO güçlü bir Th 1 tipi cevap ile sonuçlanarak intrasellüler patojenlere karşı konak savunmasında etkili olur (84). Th 1 tipi hücrelerin indüksiyonu ile IL-18 ve IL-12'nin sinerjistik etkileri gözlenmiştir (85).

NO üretimi tip-2 sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β) tarafından inhibe edilir (82).

KKKA'nde IL-10 düzeylerinin arttığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (25, 37). Hatta yüksek IL-10 düzeylerinin immüncevabı downregüle ettiği böylece immüncevabın gecikmesine neden olduğu ileri sürülmüştür (37). Hastalıkta NO düzeylerini kontrol grubunda düşük bulmamızın bir diğer nedeni de IL-10 tarafından sentezinin azaltılması olabilir.

NO'in immun regülasyonda güçlü bir rolü olduğu ve viral hastalıklar ile diğer enfeksiyon etkeni mikroorganizmalarlar arasındaki ilişki üzerine pek çok çalışma vardır (76-116, 121-135). Bunların bir kısmında virusların NO seviyesini artırdığı, bir kısmında değiştirmediği, bir kısmının ise NO yapımını baskıladığı gösterilmiştir (90). Viral enfeksiyon süresince NO'in virüs üzerinde ya da konakçı üzerinde pek çok etkileri olup; NO virüs replikasyonunu inhibe edebilir, viral mutasyona neden olabilir ve konakçıda hücre hasarı ve patolojisine sebep olabilir. NO ve peroksinitrit, enfeksiyon süresinde konak üzerine hem faydalı etkileri olan hem de patolojik lezyonlarla sonuçlanan zararlı etkileri olan iki ucu keskin kılıçlardır (92). Viral enfeksiyon süresince iNOS indüksiyonu direkt ve indirekt olarak iki yolla oluşabilir. Direkt olarak; respiratuar sinsityal virüste olduğu gibi viral replikasyon ile ya da HIV-1 glikoprotein gp41 gibi viral proteinler aracılığı ile oluşabilir (89). İndirekt mekanizma, en sık IFN-γ ve diğer kısmen tanımlanmış sitokinler gibi bir takım sitokinler tarafından indüklenmeyi içerir.

NO'in virüslerin çoğunda replikasyonu inhibe ederken, bazılarında arttırır ve birkaç tanesinin üzerinde de etkisi yoktur. Yapılan çalışmalarda, Influenza A, B, Hantavirus, Coronavirus (Sars CoV), HBV, LCMV, Coxsackievirus B3, Rabies virus, Japon ensefalit virusu (JEV), Junin virus, Dengue virus ve HIV 1 replikasyonunu inhibe ettiği, ancak Vaccinia virus replikasyonunda artışa yol açtığı, Mouse hepatit virus ve Tick-born ensefalit virusunda replikasyonu azaltmadığı gösterilmiştir (90). Yine yapılan iki ayrı çalışmada LCMV (136) ve HBV (137) replikasyonunun azaltmadığı tespit edilmiştir.

NO'in Hantavirüs replikasyonu üzerine güçlü antiviral etkileri vardır (83). Sendai viral mutasyonunu arttırır (94), Coxsackie virus, EBV, RSV enfeksiyonunu hafifletir (90).

Buna karşın literatürde çeşitli enfeksiyon etkenlerinin NO salınımını baskıladığını gösteren çalışmalar da vardır (99, 129-132, 134, 135).

Kline (99) ve arkadaşları HIV-1 transgenik rat modeli kullanılarak HIV-1 protein ekspresyonunun NO'i azalttığını ve endotelyal disfonksiyona neden olduğunu göstermişlerdir. Cairoli (133) ve arkadaşları in vitro olarak HIV ile enfekte insan periferik mononükleer hücrelerinde iNOS mRNA ve NO salınımının önemli derecede azaldığını tespit etmişlerdir.

Zaffuto ve arkadaşları (129) klasik swine fever virus (CSFV) ile enfekte makrofajlarda NO yapımını çalışmışlar ve CSFV-enfekte makrofajlarda NO seviyesinin azaldığını ve arjinaz etkinliğinin arttığını bulmuşlardır. Bunu, makrofajlardaki gen ekspresyonundaki değişiklik sonucu konakta viral modülasyon ile NO üretiminin baskıladığı şeklinde yorumlamışlardır. L-Arginin hem arginaz hem de NOS enzimleri için substrattır. Bu substrat için yarışma arginaz-1 tarafından sağlanır ve bu da NO üretimini makrofajlarda azaltır. CSFV makrofajlarda NO üretimini baskılar ve bu baskılama enfekte hücrelerde belirgin kapasite azalması yapar. Daha önceden Maarsingh ve arkadaşlarının (130) yaptığı bir çalışmada da makrofajlarda arginaz-1 aktivitesinin artmasına bağlı olarak NO üretiminin azaldığı tespit edilmiştir.

Rodriguez- Sosa ve arkadaşlarının (131) yaptığı bir çalışmada helmintle enfekte makrofajlarda da NO üretiminin azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada da tıpkı CSFV infeksiyonunda olduğu gibi yüksek prostaglandin E (PGE) seviyeleri tespit edilmiştir.

Bonaparte ve arkadaşları (132) da viral enfeksiyonlarda konakçının protein fosfatazının iNOS ve arginazı ters regule ettiğini ve bunun da virus replikasyonunda önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Bellows ve arkadaşları (134) vaccina virus ile enfekte fare makrofajlarında vaccine virusun iNOS protein ekspresyonunu engelleyerek NO üretimini düşürdüğünü göstermişler ve bu durumun makrofaj aktivitesini azalttığını iddia etmişlerdir. Bir başka çalışmada Yang (135) ve arkadaşları Marek's hastalık virusu (MDV) ile enfekte civciv mikroglial hücrelerinde viral DNA replikasyonunun iNOS ekspresyonunu baskıladığını göstermişlerdir.

Bütün bu çalışmadakilere benzer şekilde çalışma bulgularımız KKKAV'nun da NO salınımını doğrudan ya da dolaylı olarak baskılayabildiğini düşündürtmektedir.

Viral kanamalı ateşlerin patogenezinde NO'in rolü Ebola Kanamalı Ateşinde (101-103), Hanta virus enfeksiyonlarında (93, 104-106), Dengue virus enfeksiyonlarında (107-114) da araştırılmıştır. Ebola kanamalı ateşinde, NO seviyeleri, yüksek bulunmuş ve mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (101, 102). Volero ve arkadaşları ise Dengue ateşi (DF)'inde NO seviyelerinde artış oduğunu bildirmişlerdir; ancak hemorajik dengue ateşi (DHF)'li hastalarda NO seviyeleri sağlıklı kontrol grubu ile benzer bulunmuştur (107). Başka bir çalışmada da DF'li hastalarda bir savunma olarak viral yükün düşürülmesinde NO'in görev aldığı bildirilmiştir (123).

Çalışmamızdakine benzer şekilde VKA'lerde NO seviyesini düşük bulan başka araştırmacılar da mevcuttur (104, 112, 114).

Stoltz ve arkadaşları (104) yaptığı çalışmada Hantavirus enfeksiyonlarında HTNV-enfekte hücrelerin, IFN-γ ve IL-1β ile uyarılmış enfekte olmamış hücrelere nazaran daha az NO sentezlediğini gösterdiler. Bu çalışmada Hantavirus ile enfekte hücrelerin IFN-γ ve IL-1'e cevap vermediğini tespit ettiler.

Espina ve arkadaşları (114) kültürde Dengue virus tip 2 ile enfekte edilmiş makrofaj/monositlerle NO üretimini tespit edememişlerdir.

Chareonsirisuthigul ve arkadaşalarının yaptığı bir çalışmada (112) Dengue virusu (DV)'nun kültür TH-1 hücrelerinde NO salınımını azalttığını göstermişlerdir. iNOS gen ekspresyonu iki transkripsiyon faktörünce düzenlenir: STAT-1 ve IRF-1. DV antibody-dependent enhancement (ADE) infeksiyon yolunun başlangıç anti-DV mediatörünü, iNOS gen traskripsiyon faktörü (IRF-1) bozarak ve STAT-1 aktivasyonunu engelleyerek baskıladığını göstermişlerdir. Ayrıca yapılan bu çalışmada DV'nun TH hücrelerinde IFN-γ ve IL-12 salınımını da baskıladığını göstermişlerdir. Chareonsirisuthigul ve arkadaşaları iki grup hasta üzerinde çalışmışlar. İkinci Dengue Hemorajik ateşi (DHF) grubunda plazma nitrik oksid seviyesi iyileşmiş günlere kıyasla ateşli günlerde belirgin miktarda düşük bulunmuştur.

DHF grubunda en yüksek viremi seviyesi ateşli günde bulunmuşken, bu günde plasma NO seviyesinin en düşük değerde olduğu tespit edilmiş. NO seviyesi kademeli olarak iyileşmekte olan ve iyileşmiş günlerde artmış ve aynı anda DV genomik RNA plazma seviyesi belirgin miktarda azalmıştır. Nitrik oksit üretiminin baskılanması ikinci DHF hastalarında bulunmuştur ama birincil DHF hastalarında, flavivirus non-immun DHF hastalarında, bulunamamıştır. Bunun nedeni olarak ADE'nin nitrik oksit baskılanmasında bir rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir. Bu veriler nitrik oksit üretiminin baskılanmasının ADE yolağı kaynaklı enfeksiyonun ortaya çıkmasına ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar bize şunu düşündürmektedir. Sinyal ilişkili aktivasyon traskripsiyonu 1 (STAT-1) fosforilasyonunun ve interferon regülatuar faktör 1 (IRF-1) gen ekspresyonunun baskılanması; DV infeksiyonu sırasında nitrik oksit radikal üretimli başlangıç cevabının DV-ADE infeksiyonuyla downregüle edilme mekanizmasını oluşturmaktadır. Aynı çalışmada IRF-1 downregülasyonu ve STAT-1 defosforilasyonunun IL-10 upregülasyonuna eşlik ettiği bulunmuştur. IL-10'un, lipopolisakarid ile uyarılmış makrofajlarda STAT-1 ve IRF-1 aktivitesinin inhibisyonuyla iNOS gen ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. IL-12 ve IFN-γ kendilerine ait reseptörlerle etkileştikten sonra sinyal ortaya çıkar. Daha sonra sinyal ilişkili aktivasyon traskripsiyonu (STAT-1) ve IRF-1 aktive olur. Bunun sonucunda da anti-DV serbest radikallerinin güçlü üretimini sağlayan iNOS gen transkripsiyonu ve nitrik oksit radikal üretiminin aktivasyonu meydana gelir. IL-10 ve reseptörünün etkileşimi her nasılsa STAT-1 ve IRF-1 aktivasyonunu engeller, böylece NO üretimi engellenmiş olur.

Ubol ve arkadaşları (108) bazı dengue viruslarının (DV) NO'e duyarlı, bazılarının ise dirençli olduğunu göstermişlerdir. DV'nda NS5 geninde bir mutasyon sonucu NO-resistant DV oluştuğu tespit edilmiştir. NO-duyarlı DV replikasyonu, NO ile inhibe edilir. Sonuçta düşük viral yük ve hafif enfeksiyon meydana gelir. NO-rezistan DV daha virulandır. Yüksek replikasyon oranı ve konakçı genetik cevabı üzerine güçlü etkisi vardır. NO-rezistan DV, immun yanıt ilişkili genleri yüksek oranda indükler (örneğin sitokin/kemokin, T hücre, B hücre, platelet ve inflamatuar hücre aktivasyonu içeren genler). Sonuçta vasküler sızıntıya yol açacak olan platelet, endotel hücreleri ve inflamatuvar hücreler arasında etkileşim meydana gelir. NO rezistan DV, DHF gelişimindeki artışla korele olarak IL-6, IL-7, IL-8, RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) ve MCP-3 (monosit kemotaktik protin 3)'ün belirgin bir şekilde artışına neden olur (109). Schurman ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada (110) ise NO'in DF hastalarında DV'nun

replikasyonunu inhibe ettiği, şiddetli hastalıkta ise (DHF) inhibisyonun yetersiz olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda LDH ve NO arasında pozitif korelasyon saptanması NO'in oksidatif stresin bir göstergesi olması, LDH'ın da doku hasarı göstergesi olmasından kaynaklanabilir. Her ikisi de doku hasarı, doku iskemisi durumlarından etkilendiğinden çalışmamızda bu parametreler arasında pozitif korelasyon bulunmuş olabilir (138).

Sonuç olarak; NO'in immun sistem üzerine pek çok aşamada negatif ve pozitif feed-back mekanizmaları ile oluşturduğu çok yönlü etkileri mevcuttur. Çalışmamızda KKKA'nde NO sentezinin Th 1 ve Th 2 immun cevapla etkileşimi sonucu veya direkt viral etki ile azalmış olabileceğini düşünmekteyiz. KKKA'nde NO seviyelerinin kontrol grubuna göre düşük bulunması gerekli Th 1 immün cevabının oluşması için NO seviyelerinin azaltılmış olabileceğini düşündürmektedir. Fatal olgular ile kontrol grubunun NO değerleri arasında fark yokken sağ kalanlarla farklı olması da düşük düzeyde NO seviyelerinin daha iyi bir immün yanıtı sağladığının kanıtıdır. Her ne kadar çalışmamızda NO düzeylerinin sağ ve ölen hastalarda anlamlı düzeyde farka ulaşmaması prognostik bir değeri olmadığı izlenimini verse de; kontrol grubu ile sağ kalan olgular arasındaki belirgin fark aslında NO'in hastalıkta immünregülatuar bir rol oynadığını açıkça göstermektedir. Bu çalışmada ölen hasta sayısının azlığı nedeniyle fark istatistiksel anlama ulaşamamış olabilir.

NO'in KKKA patogenezindeki rolünün ve prognostik değerinin daha iyi anlaşılması için tüm immunolojik parametreleri, viral yükü ve NO değerlerini eş zamanlı ve kinetik olarak (hastalığın dönemlerine göre değişimini) araştıran daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Centers for Disease Control and Prevention. Management of patients with suspected viral hemorrhagic fever. Morb Mortal Wkly Rep 1988; 37(Suppl 3): 1-16

2. Emond RT. Viral haemorrhagic fevers. J Infect 1986;13: 103-106

3. Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Lancet Infect Dis 2006; 6:203-14

4. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Afrika. J Med Entomol1979; 15:307-417

5. Whitehouse CA. Crimean-Congo haemorrhagic fever. Antiviral Res 2004; (64):145-160.

6. Watts DM, Ksiasek TG, Linthicum KJ, Hoogstraal H: Crimean-Congo hemorrhagic fever, "Monath TP (ed): The Arboviruses: Epidemiology and Ecology", CRC, Boca Raton, FL (1988).

7. Ergonul O, Zeller H, Celikbas A, Dokuzoguz B: The lack of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibodies in healthcare workers in an endemic region. Int J Infect Dis 2007;11(1):48-51

8. Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoğuz B, Eren S, Baykam N, and Esener H. Characteristics of Patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in a Recent Outbreak in Turkey and Impact of Oral Ribavirin Therapy. Clin Infect Dis 2004;39:284-7.

9. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yılmaz M, Sonmez M, Caylan R, at al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. Emerg Infect Dis 2004; 10 (8): 1379-84.

10. Bakır M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, Bodur H, Tasyaran MA, Vahaboglu H. Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicenter study of clinical features and outcome measures. J Med Microbiol 2005;54:385-9

11. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. www.saglik.kkka.gov.tr (en son erişim:11.10.2010)

12. Elaldı N. Kırım- Kongo Hemorajik Ateşi Epidemiyolojisi. Klimik Dergisi 2004;17(3): 151-155

13. Murphy FA, Harrison AK, Tzianabos T. Electron microscopic observations of mouse brain infected with Bunyamwera group arboviruses. J Virol. 1968;2(11):1315-25.

14. Bakır M. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi, Ankem Dergisi 2004; 18:90-93

15. Hewlett MJ, Pettersson RF, Baltimore D. Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study. J Virol. 1977;21(3):1085-93.

16. Ergonul O, Whitehouse CA, eds. Crimean- Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perpective. Dordrecht: springer, 2007: pages 323-328.

17. Vatansever Z, http://www.klimik.org.tr/KKHA/Keneler ve CCHF (20.10.2011 tarihli erişim)

18. Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JA. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. Environ Health Perspect. 2001;109 Suppl 2:223-33

19. Williams RJ, Al-Busaidy S, Mehta FR, Maupin GO, Wagoner KD, Al-Awaidy S, et al. Crimean-congo haemorrhagic fever: a seroepidemiological and tick survey in the Sultanate of Oman. Trop Med Int Health. 2000;5(2):99-106.

20. Mardani M, Rahnavardi M, Rajaeinejad M, Naini KH, Chinikar S, Pourmalek F, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever among health care workers in Iran: a seroprevalence study in two endemic regions. Am J Trop Med Hyg. 2007 Mar;76(3):443-5.

21. Wölfel R, Paweska JT, Petersen N, Grobbelaar AA, Leman PA, Hewson R, at al. Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients. Emerg Infect Dis. 2007;13(7):1097-100.

22. Htt://www.who.int/csr/diesase/crimean_congoHF (Update 19/02/2009) (05.01.2012 tarihli erişim)

23. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, et al. Possible horizontal transmission of crimean-congo hemorrhagic Fever virus from a mother to her child. Jpn J Infect Dis. 2004;57(2):55-7.

24. Elaldı N. Kırım-Kongo Hemorajik Ateş Epidemiyolojisi. C.U. Tıp Fakültesi Dergisi 2004; 26: 185-90.

25. Bente DA, Alimonti JB, Shieh WJ, Camus G, Ströher U, Zaki S, Jones SM. Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model. J Virol. 2010;84(21):11089-100.

26. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitapları, 2008;1251-1264

27. Ardalan MR, Tubbs RS, Chinikar S, Shoja MM. Crimean-Congo hemorrhagic fever presenting as thrombotic microangiopathy and accute renal failure. Nephrol Dial Transplant 2006; 21: 2304-7.

28. Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman PA, Greer PW, et al. Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever

(CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. Arch Pathol Lab Med 1997; 121(8): 839-45

29. Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, Young HA, Reed DS, Geisbert JB, et al. Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic fever in cynomolgus macagues: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. Am J Pathol 2003; 163: 2347-70.

30. Chen JP, Cosgriff TM. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2000;11: 461-483.

31. Simpson DIH, Knight EM, Courtois G, Williams MC, Weinbern MP, Kibukamusoke JW. Congo virus: a hitherto undescribed virus occuring in Africa, human isolations and clinical notes. East Afr Med J 1967;44:87

32. Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, Harvey S. The clinical pathology of Crimean-Congo Hemorrhagic fever. Rev Infect Dis 1989; 11(Suppl 4): 794-800.

33. Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, Mahanty S, Sanchez AJ, Wagoner KD, et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. J Virol. 2004;78(19):10370-7.

34. Dilber E, Cakir M, Acar EA, Orhan F, Yaris N, Bahat E, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever among children in north-eastern Turkey. Ann Trop Paediatr. 2009;29(1):23-8.

35. Tasdelen Fisgin N, Fisgin T, Tanyel E, Doganci L, Tulek N, Guler N, Duru F. Crimean-Congo hemorrhagic fever: five patients with hemophagocytic syndrome. Am J Hematol. 2008;83(1):73-6.

36. Connoly –Anderson AM, Moll G, Andersson C, Mirazimi A. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus activated endothelial cells. J Virol 2011; 85(15) 7766-74.

37. Ana Saksida, Darja Duh, Branka Wraber, Isuf Dedushaj, Salih Ahmeti, et al. Interacting Roles of Immune Mechanisms and Viral Load in the Pathogenesis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Clin Vaccine Immunol. 2010 July; 17(7): 1086–1093.

38. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res. 2008;78(1):125-31.

39. Erol S, Ozkurt Z, Ozden K, Parlak M, Erol MK. Transtional bradycardia in CCHF. T J Med SCI. 2011 (yayın aşamasında).

40. Duh D, Saksida A, Petrovec M, Ahmeti S, Dedushaj I, Panning M, et al. Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. Emerg Infect Dis. 2007;13(11):1769-72.

41. Cevik MA, Erbay A, Bodur H, Eren SS, Akinci E, Sener K, et al. Viral load as a predictor of outcome in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Clin Infect Dis. 2007, 1;45(7):e96-100.

42. David-West TS. Method for accelerated identification of arboviruses after inoculation of mice. Appl Microbiol. 1972;23(3):437-40.

43. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. Epidemiol Infect. 1994;113(3):551-62.

44. Drosten C, Göttig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2323-30

45. Cevik MA, Erbay A, Bodur H, Gülderen E, Baştuğ A, Kubar A, Akinci E.Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. Int J Infect Dis. 2008;12(4):374-9.

46. CDC. Viral hemorrhagic fever: initial management of suspected an confirmed cases. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1983; 32 (Suppl 2): 27S-38S.

47. TC. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü (yayını) Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. Ankara-2004: 1-23.

48. Mardani M, Jahromi MK, Naieni KH, Zeinali M: The efficacy of oral ribavirin in the treatment of crimean-congo hemorrhagic fever in Iran, Clin Infect Dis 2003;36(12):1613-8.

49. Fisher-Hoch SP, Khan JA, Rehman S, Mirza S, Khurshid M, McCormick JB: Crimean Congohaemorrhagic fever treated with oral ribavirin, Lancet 1995;346(8973):472

50. Ozkurt Z, Kiki I, Erol S, et al: Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy, J Infect 2006;52(3):207-15.

51. Elaldi N, Bodur H, Ascioglu S, Celikbas A, Ozkurt Z, Vahapoglu H, Leblebicioglu H, Yilmaz N. Efficacy of oral ribavirintreatment in Crimean-Congo haemorrhagic fever: A quasi-experimental study from Turkey. Journal of infection 2009;58: 238-244

52. Bodur H, Erbay A, Akıncı E, Öngürü P, Bayazıt N, Eren SS, Kubar A. Effect of oral ribavirin treatment on the viral load and disease progression in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Int J Infect Dis. 2011;15(1):e44-7.

53. Knowles SR, Phillips EJ, Dresser L, Matukas L. Common adverse events associated with the use of ribavirin for severe acute respiratory syndrome in Canada. Clin Infect Dis. 2003; 15;37(8):1139-42.

54. Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R. The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. J Virol Methods. 1998;70(2):129-37.

55. Ergonul O, Celikbas A, Baykam N, Eren S, Dokuzoguz B. Analysis of risk-factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection: severity criteria revisited. Clin Microbiol Infect. 2006;12(6):551-4.

56. Jamil B, Hasan RS, Sarwari AR, Burton J, Hewson R, Clegg C. Crimean-Congo hemorrhagic fever: experience at a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005;99(8):577-84.

57. Bogdan C. The multiplex function of nitric oxide in (auto)immunity. J Exp Med. 1998; 4;187(9):1361-5.

58. Dawson VL, Dawson TM. Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. Adv Pharmacol. 1995;34:323-42.

59. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science. 1992;258(5090):1898-902

60. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprote ction-how, why, when, and where? Nitric Oxide. 1997;1(2):107-20.

61. Burgner D, Rockett D. Nitric oxide and infection diseases, Arc Dis Child 1999;81:185-188

62. Guzik TJ, Korbut R. NO and superoxide in inflamation and immune regülation. Journal of Physiology and Pharmacology:2003,54,4:469-487.

63. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. Biol Chem Hoppe Seyler. 1995;376(6):327-43.

64. Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. Life Sci. 1997;60(21):1833-45.

65. Eroglu L. Nitrik Oksit: Genel Özellikleri. Aknem Der (No. 3): 370-373

66. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt:3. Ankara: Feryal matbaası; 1990: 1170

67. Atalık EK, Dogan N. Nitrik oksit ve fizyoloji etkileri. Genel Tıp Dergisi 1997;7(3):167-169

68. Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, Besler HT. Travma ve evfeksiyonda nitrik oksitin rolü. Ulus Travma Dergisi 2004;10(3): 149-159

69. Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. Biochim Biophys Acta. 1996;1288(2):F31-6.

70. Vos TA, Gouw AS, Klok PA, Havinga R, van Goor H, Huitema S, at al. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced liver damage in rats. Gastroenterology. 1997;113(4):1323-33.

71. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. Am J Med. 2000;109(2):150-8.

72. Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. Ann Surg. 1995;221(3):220-35.

73. Unno N, Menconi MJ, Smith M, Fink MP. Nitric oxide mediates interferon-gamma-induced hyperpermeability in cultured human intestinal epithelial monolayers. Crit Care Med. 1995;23(7):1170-6.

74. Tureen J. Effect of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on cerebral oxygen uptake, cerebrospinal fluid lactate, and cerebral blood flow in the rabbit: role of nitric oxide. J Clin Invest. 1995;95(3):1086-91

75. Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Täuber MG. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. J Clin Invest. 1996;98(11):2632-9.

76. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, at al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Nature. 1995;375(6530):408-11.

77. Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, Xu D, Feng GJ, Robinson JH, at al. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. Eur J Immunol. 1998;28(12):4062-70

78. Jiménez JL, González-Nicolás J, Alvarez S, Fresno M, Muñoz-Fernández MA. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes by nitric oxide. J Virol. 2001;75(10):4655-63.

79. Van Dervort AL, Yan L, Madara PJ, Cobb JP, Wesley RA, Corriveau CC, et al. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-alpha production by human neutrophils. J Immunol. 1994;152(8):4102-9.

80. Diefenbach A, Schindler H, Röllinghoff M, Yokoyama WM, Bogdan C. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. Science. 1999;284(5416):951-5.

81. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J Immunol. 1988 Oct 1;141(7):2407-12.

82. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997;15:323-50.

83. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan JF. Essential Role of Induced Nitric Oxide in the Initiation of the Inflammatory Response after Hemorrhagic Shock. J Exp Med. 1998 16; 187(6): 917–928

84. Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. Ann Rheum Dis. 2006;65 Suppl 3:iii37-40.

85. Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. Immunity. 1997;7(4):571-81.

86. Umansky V, Hehner SP, Dumont A, Hofmann TG, Schirrmacher V, Dröge W, Schmitz ML. Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism. Eur J Immunol. 1998;28(8):2276-82.

87. Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. J Immunol. 2001;166(6):3873-81.

88. Niedbala W, Cai B, Liu H, Pitman N, Chang L, Liew FY. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(39):15478-83.

89. Akaike T, Maeda H. Nitric oxide and virus infection. Immunology. 2000;101(3):300-8.

90. Umesh C. Chatuverdi, Nagar R. Nitric oxide and dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nusance?, FEMS immunol Med Microbiol 56,(2009)9-24.

91. Zaragoza C, Ocampo CJ, Saura M, McMillan A, Lowenstein CJ. Nitric oxide inhibition of coxsackievirus replication in vitro. J Clin Invest. 1997;100(7):1760-7.

92. Padalko E, Ohnishi T, Matsushita K, Sun H, Fox-Talbot K, Bao C, et al. Peroxynitrite inhibition of Coxsackievirus infection by prevention of viral RNA entry. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(32):11731-6.

93. Klingström J, Akerström S, Hardestam J, Stoltz M, Simon M, Falk KI, at al. Nitric oxide and peroxynitrite have different antiviral effects against hantavirus replication and free mature virions. Eur J Immunol. 2006;36(10):2649-57.

94. Yoshitake J, Akaike T, Akuta T, Tamura F, Ogura T, Esumi H, Maeda H. Nitric oxide as an endogenous mutagen for Sendai virus without antiviral activity. J Virol. 2004;78(16):8709-19.

95. Zaki MH, Akuta T, Akaike T. Nitric oxide-induced nitrative stress involved in microbial pathogenesis. J Pharmacol Sci. 2005;98(2):117-29.

96. Zsengeller ZK, Ross GF, Trapnell BC, Szabo C, Whitsett JA. Adenovirus infection increases iNOS and peroxynitrite production in the lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001;280(3):L503-11.

97. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Lee KJ, Levine AM, Lai MM. Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. J Virol. 2004;78(16):8835-43.

98. Lee CH, Choi YH, Yang SH, Lee CW, Ha SJ, Sung YC. Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from ac tivatedmacrophages. Virology. 2001;279(1):271-9.

99. Kline ER, Kleinhenz DJ, Liang B, Dikalov S, Guidot DM, Hart CM, at al. Vascular oxidative stress and nitric oxide depletion in HIV-1 transgenic rats are reversed by glutathione restoration. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294(6):H2792-804

100. Gomez RM, Yep A, Schattner M, Berría MI. Junin virus-induced astrocytosis is impaired by iNOS inhibition. J Med Virol. 2003;69(1):145-9.

101. Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, Mahanty S, Sanchez AJ, Wagoner KD, Rollin PE. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases

of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. J Virol. 2004;78(19):10370-7.

102. Hensley LE, Geisbert TW. The contribution of the endothelium to the development of coagulation disorders that characterize Ebola hemorrhagic fever in primates. Thromb Haemost. 2005;94(2):254-61.

103. Hensley LE, Young HA, Jahrling PB, Geisbert TW. Proinflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily. Immunol Lett. 2002;80(3):169-79.

104. Stoltz M, Ahlm C, Lundkvist A, Klingström J. Lambda interferon (IFN-lambda) in serum is decreased in hantavirus-infected patients, and in vitro-established infection is insensitive to treatment with all IFNs and inhibits IFN-gamma-induced nitric oxide production. J Virol. 2007;81(16):8685-91.

105. Davis IC, Zajac AJ, Nolte KB, Botten J, Hjelle B, Matalon S. Elevated generation of reactive oxygen/nitrogen species in hantavirus cardiopulmonary syndrome. J Virol. 2002;76(16):8347-59.

106. Klingström J, Plyusnin A, Vaheri A, Lundkvist A.Wild-type Puumala hantavirus infection induces cytokines, C-reactive protein, creatinine, and nitric oxide in cynomolgus macaques. J Virol. 2002;76(1):444-9.

107. Valero N, Espina LM, Añez G, Torres E, Mosquera JA. Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(6):762-4.

108. Ubol S, Chareonsirisuthigul T, Kasisith J, Klungthong C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. Virology. 2008;376(2):290-6.

109. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. J Med Virol. 1999;59(3):335-40.

110. Schurman L, Sedlinsky C, Mangano A, Sen L, Leiderman S, Fernandez G, et al. Estrogenic status influences nitric oxide-regulated TNF-alpha release from human peripheral blood monocytes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2001;109(6):340-4.

111. Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. J Gen Virol. 2006;87(Pt 10):3003-11.

112. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. J Gen Virol. 2007;88(Pt 2):365-75.

113. Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. BMC Infect Dis. 2005;5:64

114. Espina LM, Valero NJ, Hernández JM, Mosquera JA. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(1):48-53

115. Tutuncu E, Gurbuz Y, Ozturk B, Kuscu F. Serun nitric oxide levels in patient with Crimean-Congo haemorrhagic fever, Scandinavian Journal of infectious Diseases, 2010;42: 385-388

116. Simon M, Falk KI, Lundkvist A, Mirazimi A. Exogenous nitric oxide inhibits Crimean Congo hemorrhagic fever virus. Virus Res. 2006;120(1-2):184-90

117. H. Moshage, B.Kok, J.R. Huizange et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. Clin Chem. 41(1995), pp 892-896

118. P.N.Bories and C. Bories. Nitrate Determination in Biological Fluids by an Enzymatic Onee-Step Assay with Nitrate Redüktase. Clin Chem. 41/6 (1995): 904-907.

119. Ergonul O, Tuncbilek S, Baykam N, Celikbas A, Dokuzoguz B. Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. J Infect Dis 2006; 193: 941-4.

120. Ozkurt Z, Kadanalı A, Erol S, Aksoy O, Parlak M. Dermatologic lesions of Crimean Congo hemorrhagic fever. Poster No 117. The 3rd Euroasia Congress of Infectious Diseases, 1-4 October 2009, Bakü, Azerbaycan

121. Rimbach G, Park YC, Guo Q, Moini H, Qureshi N, Saliou C, Takayama K, Virgili F, Packer L. Nitric oxide synthesis and TNF-alpha secretion in RAW 264.7 macrophages: mode of action of a fermented papaya preparation. Life Sci. 2000; 67(6):679-94.

122. Ireland DD, Palian BM, Reiss CS.Interleukin (IL)-12 receptor beta1 or IL-12 receptor beta 2 deficiency in mice indicates that IL-12 and IL-23 are not essential for host recovery from viral encephalitis. Viral Immunol. 2005;18(2):397-402.

123. Faqundes CT, Costa VV, Cisalpino D, Amaral FA, Souza PR, Souza RS, Ryffel B, et al. IFN-γ Production Depends on IL-12 and IL-18 Combined Action and Mediates Host Resistance to Dengue Virus Infection in a Nitric Oxide-Dependent Manner. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(12):e1449.

124. Proto S, Taylor JA, Chokshi S, Navaratnam N, Naoumov NV. 6-APOBEC and iNOS are not the main intracellular effectors of IFN-gamma-mediated inactivation of Hepatitis B virus replication. Antiviral Res. 2008;78(3):260-7.

125. Do Thi Thu Hang, Jae-Young Song, Min-Young Kim, Jin-Woo Park, Yeun-Kyung Shin. Involvement of NF-κB in changes of IFN-γ-induced CIITA/MHC-II and iNOS expression by influenza virus in macrophages. Molecular Immunology, Volume 48, Issues 9–10, 2011, Pages 1253-1262

126. Paludan SR, Malmgaard L, Ellermann-Eriksen S, Boscá L, Mogensen SC. 17-Interferon (IFN)-gamma and Herpes simplex virus/tumor necrosis factor-alpha synergistically induce nitric oxide synthase 2 in macrophages through cooperative action of nuclear factor-kappa B and IFN regulatory factor-1. Eur Cytokine Netw. 2001;12(2):297-308.

127. Jarasch N, Martin U, Kamphausen E, Zell R, Wutzler P, Henke AInterferon-gamma-induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3. Viral Immunol. 2005;18(2):355-64.

128. Andersson I, Lundkvist A, Haller O, Mirazimi A. Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. J Med Virol. 2006; 78(2):216-22.

129. Zaffuto KM, Piccone ME, Burrage TG, Balinsky CA, Risatti GR, Borca MV, et al. Classical swine fever virus inhibits nitric oxide production in infected macrophages. J Gen Virol. 2007;88(Pt 11):3007-12.

130. Maarsingh H, Leusink J, Zaagsma J, Meurs H. Role of the L-citrulline/L-arginine cycle in iNANC nerve-mediated nitric oxide production and airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. Eur J Pharmacol. 2006;546(1-3):171-6.

131. Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderón R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. Infect Immun. 2002;70(7):3656-64.

132. Bonaparte KL, Hudson CA, Wu C, Massa PT.Inverse regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase I by the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in CNS glia. Glia. 2006;53(8):827-35.

133. Cairoli E, Scott-Algara D, Pritsch O, Dighiero G, Cayota A**.** HIV-1 induced decrease of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression during in vivo and in vitro infection. Clin Immunol. 2008;127(1):26-33.

134. Bellows CF, Garry RF, Jaffe BM. Vaccinia virus-induced inhibition of nitric oxide production. J Surg Res. 2003;111(1):127-3

135. Yang Q, Wei P, Chen H. Cytokine responses and inducible nitrous oxide synthase expression patterns in neonatal chicken brain microglia infected with very virulent Marek's disease virus strain YL040920. Vet Immunol Immunopathol. 2011;142(1-2):14-24.

136. Bartholdy C, Nansen A, Christensen JE, Marker O, Thomsen AR Inducible nitric-oxide synthase plays a minimal role in lymphocytic choriomeningitis virus-induced, T cell-mediated protective immunity and immunopathology. J Gen Virol. 1999;80 (Pt 11):2997-3005.

137. Proto S, Taylor JA, Chokshi S, Navaratnam N, Naoumov NV. APOBEC and iNOS are not the main intracellular effectors of IFN-gamma-mediated inactivation of Hepatitis B virus replication. Antiviral Res. 2008;78(3):260-7.

138. Rana T, Bera AK, Das S, Pan D, Bandyopadhyay S, Bhattacharya D, et al. Effect of ascorbic acid on blood oxidative stress in experimental chronic arsenicosis in rodents. Food Chem Toxicol. 2010;48(4):1072-7

EKLER

Ek 1.

KKKA HASTA TAKİP FORMU												
HASTA BİLGİLERİ												
ADI		YAŞ		KENE TEMASI	VAR □ YOK□	ADRES BİLGİLERİ						
SOYADI		MESLEK		KULUÇKA SÜRESİ								
DOSYA NO		YATIŞ TARİHİ		KAN ALMA GÜNÜ								
SEMPTOMLAR												
ATEŞ	VAR □ YOK□	İŞTAHSIZLIK	VAR □ YOK□	İSHAL	VAR □ YOK□	ŞUUR DEĞİŞİKLİĞİ	VAR □ YOK□					
HALSİZLİK	VAR □ YOK□	BULANTI	VAR □ YOK□	DÖKÜNTÜ	VAR □ YOK□	ÖKSÜRÜK	VAR □ YOK□					
BAŞ AĞRISI	VAR □ YOK□	KUSMA	VAR □ YOK□	KANAMA	VAR □ YOK□	KARIN AĞRISI	VAR □ YOK□					
KLİNİK BULGULAR												
FASİAL HİPEREMİ	VAR □ YOK□	LAP	VAR □ YOK□	AC MUYENE BULGULARI								
KONJUNKTİVAL HİPEREMİ	VAR □ YOK□	HMG	VAR □ YOK□	RADYOLOJİK BULGU								
DÖKÜNTÜ	VAR □ YOK□	SMG	VAR □ YOK□	DİĞER BULGULAR								
OROFARENKS MUAYENE BULGULARI												
LABORATUAR BULGULARI												
PLT		ALT		LDH		PT		INR				
WBC		AST		CK		PTT		NO DÜZEYİ				
TEDAVİ												
TROMBOSİT	EVET□ HAYIR□	TAM KAN		EVET□ HAYIR□	PALMAFEREZ		EVET□ HAYIR□					
TDP	EVET□ HAYIR□	ERİTROSİT		EVET□ HAYIR□	İMMUN SERUM		EVET□ HAYIR□					
		RİBAVİRİN		EVET□ HAYIR□	DİĞER							
SONUÇ	ŞİFA		EKSİTUS									

Ek:2

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Çalışmanın Adı: Kırım Kongo kanamalı ateşinde hemostaz göstergelerinin ve çeşitli immun parametrelerin serum seviyelerinin ve klinik seyirle ilişkisinin araştırılması

Amacı: Bu çalışma Kırım Kongo kanamalı ateşinde hastalarda kanamaya neden olan süreçte hangi maddelerde değişiklik olduğunun anlaşılması amacıyla planlanmıştır. Hastalığın tedavisi için faydalı olacak bilgilerin elde edilmesi, elde edilecek bilgilerin daha sonraki hastalara faydalı olmak için, yeni tedaviler araştırmak, geliştirmek için kullanılması ümit edilmektedir. Bu çalışmanın şu anda takip edilen hastadan ziyade sonraki hastalar için fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Metod: Çalışma için hasta servise ilk yattığında alınan kanlardan sadece 1 kez kan alınacak. Çalışma için ölçülecek parametreler hastadan bir kez alınan kanda yapılacaktır. Zaten hastaların izlenmesi esnasında trombosit sayıları düşük olduğundan tedavinin yönetimi açısından günde iki kez hemogram istenmekte, trobmbosit replasmanlarına bu tetkiklerin sonuçlarına göre karar verilmektedir. Çalışma kanı için hastanın damarına ayrı bir girişim yapılmayacak, sadece bir kez zaten kan alınırken yaklaşık 5 cc kan çalışma için ayrılacaktır. Çalışmalar hastanemiz laboratuarlarında yapılacaktır.

Gönüllünün araştırmaya katılacağı süre: Kan alma süresi 1-2 dakika

Karşılaşılabilecek güçlükler: Kan alma sırasında acıma ve ilgili bölgede morarma görülebilir. Ancak zaten çalışma için ayrıca damara girişim yapılmayacak. Zaten tanı ve tedavi prosedürü için kan alınırken bir miktar da çalışma için alınacak.

Kişi veya kişiler için araştırmadan beklenilen tıbbi yarar: Bu çalışmanın şu anda takip edilen hastadan ziyade sonraki hastalar için tanı ve ilerde destek tedavilerini geliştirme konusunda fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Muhtemel zarar durumunda gönüllünün veya yakının bilgi için ilişki kuracağı kişinin ismi: Hasta ilk yatışta zaten alınan kanlarda çalışma yapılacağı için hastanede olduğu dönemde gelişebilecek her türlü sorun serviste ilgili asistan tarafından giderilecektir.

- Gönüllüye araştırmaya katılmayı red etme hakkına sahiptir

- Gönüllünün kendi rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabileceğinin bildirilmesi.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı: Telefon no:

Adresi (varsa, faks no.):

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya velisinin Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, İmzası, Görevi:

Hemşire:

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

ENFEKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI ABAŞKANLIĞI

"Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalarında Serum Nitrik Oksit Seviyelerinin Klinik ve Prognozla ilişkisi"

Dr. Cezmi KARACA

Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi :21.08.2006
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi : 08.03.2012
Uzmanlık Sınavı Tarihi : 08.03.2012
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zülal ÖZKURT
Jüri üyesi : Prof. Dr. Mehmet PARLAK
Jüri üyesi : Prof. Dr. Serpil EROL
Jüri üyesi : Prof. Dr. Mustafa BÜYÜKAVCI
Jüri üyesi : Doç. Dr. İlhami KİKİ

Prof. Dr. Mehmet PARLAK
Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim dalı Başkanı

Mart-2012
ERZURUM