

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA) OLAN
HASTALARDA TROMBİN DÜZEYLERİNİN APOPİTOTİK
BELİRTEÇLER İLE KORELASYONUNUN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ahmet KAYMAZ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA
2016

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA) OLAN
HASTALARDA TROMBİN DÜZEYLERİNİN APOPİTOTİK
BELİRTEÇLER İLE KORELASYONUNUN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ahmet KAYMAZ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten AKSOY

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından 24.06.2015 tarih ve 15097 protokol numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2016

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım esnasında bana her konuda yardım eden, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, hoşgörü ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurten AKSOY'a,

Asistanlığımın ilk yıllarında bilgi ve deneyimlerini bizlere aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT ve Doç. Dr. Şahbette SELEK'e,

Yetişmemde katkıları olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hatice SEZEN ve Yrd. Doç. Dr. Emin ŞAVİK'e,

Asistan iken kendileriyle birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, zorlu çalışma koşullarına rağmen büyük bir özveri ve sabırla çalışan değerli Uzman arkadaşlarım Uzm. Dr. Selçuk AKIN, Uzm. Dr. Murat ÜSTÜNEL, Uzm. Dr. Bülent ADAR ve Uzm. Dr. Ali Said KADAK'a ve tüm Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına,

Tez çalışmamdaki değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Fazilet DUYGU hocama, Tıbbi Biyokimya A.D. Öğretim görevlisi Abdullah TAŞKIN, Yrd. Doç. Dr. Hasan BİLİNÇ ve Begüm Hilal CEYLAN'a,

Asistanlığıma başladığım günden itibaren her türlü katkılarından dolayı başta Sayın M. Murat ALKAN ve Sayın Tevrat ZERAY olmak üzere tüm Dekanlık personeline,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana her konuda desteğini esirgemeyen ve fedakarlıkları ile eşsiz olan "ANNEME", Abime ve eşim Fulya KAYMAZ ile çocuklarım İslim, Mustafa ve Mehmet Nur'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr Ahmet KAYMAZ

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	IV
TABLO LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi	3
2.1.1. Tanımı	3
2.1.2. Tarihçe	3
2.1.3. Virüsün Yapısı ve Moleküler Biyolojisi	4
2.1.3.1. Sınıflandırılması	4
2.1.3.2. Yapısı ve Replikasyonu	4
2.1.3.3. Türleri ve Filogenetik ilişkiler	6
2.1.4. Epidemiyoloji	6
2.1.5. Bulaşma ve Risk Grupları	8
2.1.6. Patogenez	9
2.1.7. Klinik Bulgular	11
2.1.8. Laboratuvar Bulguları	12
2.1.9. Tanı	13
2.1.9.1. Non-Spesifik Laboratuvar Testleri	13
2.1.9.2. Virüs İzolasyonu	14
2.1.9.3. İmmünolojik Yöntemler	14
2.1.9.4. Moleküler Yöntemler	14
2.1.10. Ayırıcı Tanı	14
2.1.11. Tedavi	15
2.1.12. Korunma ve Kontrol	16
2.2. Trombin	17
2.2.1. Genel Özellikleri	17

2.2.2. Hemostaz	17
2.2.2.1. Vazokonstriksiyon (Vasküler Faz)	18
2.2.2.2. Primer Hemostaz (Trombosit Fazı)	19
2.2.2.3. Sekonder Hemostaz (Koagülasyon Fazı)	20
2.2.2.4. Fibrinolizis	21
2.2.3. Trombinin Hemostazdaki Rolü	22
2.3. Apoptozis	23
2.3.1. Apoptozis ile Nekroz Arasındaki Farklar	23
2.3.2. Apoptozis Mekanizmaları	24
2.3.2.1. Eksrensek Yol	24
2.3.2.2. İntrensek Yol	25
2.3.3. Apoptozisin Düzenlenmesi	26
2.3.4. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	30
2.3.4.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	30
2.3.4.2. İmmünohistokimyasal Yöntemler	31
2.3.4.3. Biyokimyasal Yöntemler.	32
2.3.4.4. İmmunolojik yöntemler	32
2.3.4.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Demirbaş Malzemeler	34
3.1. Hasta Seçimi	35
3.2. Trombin Düzeyi Ölçümü	35
3.3. Kaspaz 3 Düzeyi Ölçümü	36
3.4. Kaspaz 7 Düzeyi Ölçümü	36
3.5. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
6. KAYNAKLAR	50

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil-1	: Bunyaviridae viriyonunun kesitsel görünümü	5
Şekil 2	: Hyalomma marginatumun yaşam döngüsü	8
Şekil-3	: Viral kanamalı ateş hastalıklarda patogenez	10
Şekil-4	: KKKA'nın klinik ve laboratuvar seyri	13
Şekil-5	: Hemostatik denge	18
Şekil-6	: Primer hemostaz	19
Şekil-7	: Sekonder hemostazda ekstrinsek ve intrinsek yol	21
Şekil-8	: Fibrinolizis	22
Şekil-9	: Apoptozda temel moleküler yolların şematik gösterimi	26
Şekil-10	: Kaspaz kaskad aktivasyonu	29
Şekil-11	: Hasta ve kontrol gruplarında Trombin düzeyleri	37
Şekil-12	: Hasta ve kontrol gruplarında Kaspaz 3 düzeyleri	38
Şekil-13	: Hasta ve kontrol gruplarında Kaspaz 7 düzeyleri	38

TABLO LİSTESİ**SAYFA NO**

Tablo-1	: Bunyaviridae ailesi	4
Tablo-2	: Türkiye’de 2002-2009 yılları KKKK hastalığı vaka ve ölüm sayıları	7
Tablo-3	: Türkiye’den bildirilen KKKK olgularında belirti ve bulgular	12
Tablo-4	: Ayırıcı tanı	15
Tablo-5	: Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar	24
Tablo-6	: Hasta ve Kontrol gruplarının Trombin, Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 düzeyleri	36
Tablo-7	: Trombin, Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 düzeyleri arasındaki korelasyon tablosu	39

KISALTMALAR

KKKA	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi
KKKAH	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi Hastalığı
KKKAV	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü
VKA	: Viral kanamalı ateş
AST	: Aspartat amino transferaz
ALT	: Alanin amino transferaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
nm	: Nanometre
NP	: Nükleokapsit protein
RES	: Retiküloendoteliyal sistem
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
DİK	: Dissemine intravasküler koagülasyon
MODS	: Multiorgan yetmezlik sendromu
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
CPK	: Kreatinin fosfokinaz
PT	: Protrombin zamanı
APTT	: Aktive parsiyel tromboplastin zaman
INR	: Uluslararası düzeltme oranı
ELISA	: Enzim bağlı immunosorbent test

IFA	: İndirekt floresan antikor
IFAT	: İndirekt floresan antikor testi
PCR (PZR)	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	: Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
DEET	: N,N-dietil- metatoluamid
vWF	: von Willebrand faktör
TXA2	: Tromboksan A2
ADP	: Adenozin difosfat
TF	: Doku Faktörü
FI-XIII	: Faktör 1-13
PF3	: Trombosit faktör 3
Ca	: Kalsiyum
t-PA	: Doku plazminojen aktivatörü
u-PA	: Ürokinaz plazminojen aktivatörü
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PAI-2	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-2
α2AP	: Alfa 2 antiplazmin
NK	: Naturel Killer
IFN	: İnterferon
IFN-γ	: İnterferon gama
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptör
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DR5	: Ölüm Reseptörü 5

sTNF-R	: Soluble tümör nekrozis faktör reseptörü
CAD	: Kaspaz aktive edici DNaz
Smac	: Mitokondri kaynaklı sekonder kaspaz aktivatörü
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
IAF	: İnhibitör apoptotik faktör
ICAD	: İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
FADD	: Fas-ilişkili ölüm alanı proteini
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
APAF-1	: Apoptoz aktive edici faktör 1
Mg	: Magnezyum
IAP	: Apoptozis inhibitör proteinleri
TdT	: Terminal deoksiribonükleotid transferaz
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
WBC	: Beyaz kan hücreleri (Lökositler)
Ig M	: İmmunglobulin M
Ig G	: İmmunglobulin G
IL	: İnterlökin
PARP	: Poli ADP riboz polimeraz
NF-κB	: Nüklear faktör kappa B
PAR-1	: Proteinaz aktive eden reseptör-1
PBS	: Phosphate buffered saline
USA	: United States of America

SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TOS	: Total oksidatif seviye
LOOH	: Lipid peroksidasyonu
OSI	: Oksidatif stres indeksi
CAT	: Katalaz
TAS	: Total antioksidan seviye
APC	: Aktive protein-C
CRP	: C-Reaktif protein
Sit-C	: Sitokrom C

ÖZET

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA) OLAN HASTALARDA TROMBİN DÜZEYLERİNİN APOPİTOTİK BELİRTEÇLER İLE KORELASYONUNUN İNCELENMESİ

Dr. Ahmet KAYMAZ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Giriş ve Amaç: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) son zamanlarda ülkemizde de sık görülen, ölümlü sonuçlanabilen ciddi bir hastalıktır. Hastalık genellikle Hyalomma cinsi kenelerin ısırmasıyla bulaşır. Klinik ani yükselen ateş, halsizlik, miyalji, bulantı-kusma ile başlar, ağır vakalarda kanamalar görülür. Trombositopeni değişmez laboratuvar bulgusudur. Ayrıca AST, ALT, LDH, CK enzimlerinde yükseklik, PT, APTT gibi hemostaz testlerinde uzama görülür. KKKA'nın patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. KKKA hastalarında apoptozis belirteçlerinden bazılarının arttığı tespit edilmiştir. Örneğin kaspaz 3, sFasL, Perforin gibi. Hem prokoagülan hemde anti-koagülan fonksiyon gösteren ve kısa yarı ömürlü bir serin proteaz olan Trombinin yüksek konsantrasyonlarda birçok hücrede apoptozisi uyardığı gösterilmiştir

Bizde bu çalışmamızda KKKA tanısı alan hastalarda trombin düzeylerinin apoptotik belirteçler ile korelasyonunu araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız KKKA tanısı alan 44 hasta ve aynı sayıdaki hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyete sahip sağlıklı erişkin gönüllülerden oluşturuldu. KKKA olduğu düşünülen hastaların tanıları, KKKA referans laboratuvarında (Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü) serolojik testler ELISA (IgM) ya da PCR testleri tarafından teyit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda trombin, kaspaz 3 ve kaspaz 7 düzeyleri ELISA (Enzim bağlı immunosorbent test) ile bakıldı. Sonuçlar SPSS Versiyon 11.5 bilgisayar programında analiz edildi.

Bulgular: Yaptığımız çalışmada sağlıklı kontrol serumlarına göre KKKK tanısı alan hasta serumlarında trombin düzeyleri ($p<0,001$), Kaspaz 3 düzeyleri ($p<0,001$) ve Kaspaz 7 düzeyleri ($p=0.003$) anlamlı yüksek bulundu. Trombin ile Kaspaz 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki ($p=001$) varken Kaspaz 7 arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p=0.089$). Ayrıca Kaspaz 3 ile Kaspaz 7 arasında da anlamlı bir ilişki yoktu.

Tartışma ve Sonuç: Çalışmamızın sonuçları daha önce yapılan bazı çalışmalara benzer şekilde KKKK etiopatogenezinde ve klinik seyrinde apoptozisin rol oynayabileceği düşüncesini desteklemektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda trombinin yüksek konsantrasyonlarda kaspaz 3'ü aktive ederek trombositlerde apoptozisi uyardığı, aynı zamanda trombositopeninin apoptosize bağlı olabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda Trombin ile Kaspaz 3 arasında pozitif bir korelasyon ($p=001$) bulunması bu hastalarda trombin tarafından apoptozisin uyarılabileceğini görüşünü desteklemektedir. Bu hastalardaki trombin ile apoptozis arasındaki temel patofizyolojik ilişkiyi aydınlatabilecek daha detaylı ve kapsamlı çalışmaların hastalığın etiopatogenezinde ve tedavisinde önemli ölçüde katkı yapacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: KKKK, Trombin, Apoptozis, Kaspaz 3 ve Kaspaz 7

SUMMARY

Investigation of The Correlation Between Thrombin Levels and Pro-Apoptotic Markers in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) Patients

Ahmet KAYMAZ, MD,

Specialty Thesis, Department of Medical Biochemistry

Introduction and aim: Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), commonly seen in our country recently, is a serious disease that could be fatal. The disease is usually transmitted by the bite of ticks of the genus *Hyalomma*. Clinical symptoms of CCHF such as sudden fever, malaise, myalgia, nausea, vomiting are accepted as acute phase symptoms and bleeding is seen in severe cases. Constant Thrombocytopenia is one of the important laboratory findings. In addition, liver enzymes including AST, ALT, LDH, and CK are elevated and hemostasis tests (PT and APTT) are prolonged. The pathogenesis of CCHF is not fully understood. Increased profiles in some of apoptosis markers such as Caspase 3 and perforine in CCHF patients are reported in previous studies. Thrombin (which belongs serine protease family, has pro-coagulant and anti-coagulant functions, with short half-live) has been shown to induce apoptosis in many cells at high concentrations.

In this present study, we aimed to investigate the correlation between apoptotic markers (Caspase 3 and 7) and thrombin levels in CCHF patients.

Materials and methods: In present study, we used blood sera which were collected from CCHF diagnosed patients (n=44) and healthy adult volunteers with similar age and gender (n=44) as materials. CCHF disease was diagnosed by serological testing (ELISA, IgM) and confirmed by PCR in a reference laboratory (Refik Saydam Hygiene Institute). Serum levels of thrombin, caspase 7 and caspase 3 were measured by ELISA tests. Statistical analyzes of data were done by using SPSS[®] for windows (version 11.5).

Results: Compared to the healthy controls, levels of thrombin ($p < 0.001$), Caspase 3 ($p < 0.001$) and caspase 7 ($p = 0.003$) were significantly higher in CCHF patient' serum. There was a positive correlation between thrombin and caspase 3 ($p=0.001$), but not for caspase 7. Moreover, the correlation between caspase 3 and caspase 7 is not significant.

Discussion and Conclusion: Consistent with previous studies, the results of our study clearly supported the idea that apoptosis may play a role in etiopathogenesis and the clinical course in CCHF. Previous reports also indicated that high concentration of thrombin may induce apoptosis in thrombocytes by activating caspase 3 and thrombocytopenia could be associated with apoptosis. In our study, a positive correlation between thrombin and caspase 3 also supported previous findings. Detailed and comprehensive further studies aiming to solve the basic pathophysiologic relationship between thrombin and apoptosis could make a significant contribution to the etiopathogenesis and treatment of CCHF.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever, Apoptosis, Thrombin, Caspase 3 and Caspase 7

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) kenelerden insanlara bulaşan virüslerden kaynaklanır ve isminden de anlaşılacağı gibi sebep olduğu kanamalar nedeniyle yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. KKKA, Bunyaviridae ailesinin Nairovirus türünden virüslerle meydana gelen, mortalite oranı %3 ile 30 arasında değişen bir hastalıktır (1, 2).

Klinik tablo bazı hastalarda hafif seyrederken bazı hastalarda ölüme neden olabilecek kadar ağır seyredebilir. Hafif vakalarda üşüme ve titremeyle artan ateş, halsizlik, baş ve boğaz ağrısı, bulantı-kusma gibi semptomlar görülürken, ağır vakalarda ciddi kanamalar, bilinç bulanıklığı, şok gibi tablolar ve hatta ölüm görülebilir (2, 3). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığında (KKKAH) erken tanı konması ve tedavi edilmesi, hastane enfeksiyonlarına yol açabilmesi ve yüksek mortalite hızına sahip olması nedeniyle çok önemlidir (2, 4).

KKKAH'ya neden olan virüslerin esas rezervuarı doğada bulunan kenelerdir. Yurdumuzda Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüs'ünün (KKKAV) asıl vektörü Hyalomma marginatum'dur. Genellikle bodur ormanlık alanlarda yer almakla birlikte ülkemizin her tarafında bulunmaktadır (5, 6). İlimizde de 2012 yılında ilk KKKAH olgusu Daldal A. ve ark. tarafından tespit edilmiştir (7).

Viral Kanamalı Ateş (VKA) içinde dünya coğrafyasında en yaygın olarak görüleni KKKA'dır ve 30'un üzerinde ülkede görülmüştür (2). Ülkemizde başta Tokat, Sivas, Yozgat, Çorum olmak üzere en çok orta anadolu bölgesinde görülmektedir. Ülkemizde serolojik olarak KKKA bildirimleri 2002 yılı ve sonrasında belirgin bir artış göstermektedir. KKKA görülen vakalar, sıklıkla tarım ve hayvancılıkla uğraşan, aktif çalışma yaşında keneye maruz kalma oranı yüksek olan popülasyonda yoğunlaşmaktadır. Ülkemizde görülen salgında vakaların çoğunluğu (83 olgu, % 90'ı) çiftçiydi ve vakaların % 60'ında ateş başlamadan önce bir kene ısırığı öyküsü vardı. En fazla etkilenen ikinci grubu sağlık çalışanları oluşturmaktadır (8-10).

Trombin, protrombinaz kompleks varlığında protrombinden meydana gelen, tripsin benzeri serin proteaz içeren, "koagülasyon faktör II" olarak da bilinen iki zincirli bir moleküldür (11).

Prokoagülan olan trombinin antikoagülan fonksiyonu da vardır. Trombin antikoagülan özelliğini endoteldeki kofaktörü trombomodüline bağlanıp protein C'yi aktive ederek gösterir. Trombinin sitokin benzeri etkisi ve büyüme faktörü fonksiyonları da vardır. Bu nedenle, enflamasyonda, yara iyileşmesinde ve aterosklerozda da rolü olabilir (12). Ayrıca yüksek trombin düzeylerinin apoptozisi indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (13, 14).

Apoptozis fetal hayatta ve erişkin dokulardaki bir çok fizyolojik olayda kritik bir öneme sahip olduğu gibi doku homeostazının devamında da önemli bir rolü vardır (15). Bununla birlikte hücreler, çeşitli nedenlerle (hastalıklar, zararlı ajanlar gibi) hasara uğradığında ya da immun reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkabilir (16-18).

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'nin patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Koagülasyon faktör düzeyleri, antikoagülan protein değişiklikleri ve hastalardaki fibrinolitik sistem değişiklikleri sınırlı sayıda çalışmada araştırılmıştır (19-21). Orta düzeydeki trombinin hipokampal hücreleri ve astrositleri hipoglisemi, oksidatif stres ve beta amiloid toksisitesi gibi zararlı hücresel etkilerden koruduğu, yüksek düzeylerinde ise aynı hücrelerin stres oluşturulmamış ortamlarda hücresel ölüme yol açtığı belirtilmiştir (22). Yapılan bir çalışmada yüksek trombin düzeylerinin insan keratinosit hücrelerinde apoptozisi indüklediği belirtilmiştir (13)

Bu çalışmamızda şiddetli vakalarda ölümcül olabilen, ateş ve kanamalarla seyreden KKKK hastalığının etyopatogenezinde ve klinik seyrinde rolü olabileceğini düşündüğümüz trombin ve apoptotik markırları birlikte değerlendirerek trombin-apoptozis ilişkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi

2.1.1. Tanımı

VKA birçok virüs ile ilişkili, ateş ve kanama ile seyreden akut sistemik tutulumlu hastalıkları tanımlayan bir terimdir (23). KKKA Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu olmak üzere yaklaşık otuz ülkede tanımlanmış bir VKA enfeksiyonudur (2). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV), Bunyaviridae ailesinin Nairovirus türüne dahildir ve insanlarda %3-30 arasında mortaliteyle seyreden ciddi tablolara yol açar (24, 25). KKKA çoğunlukla kenelerle ve enfekte canlıların kan ve vücut sıvılarıyla temas sonucunda bulaşan bir hastalıktır (2).

2.1.2. Tarihçe

KKKA, ilk defa 1944-1945 yıllarında 2. Dünya Savaşı sırasında Kırım'da yaklaşık 200 sovyet askerinin bölgedeki köylülere yardım ederken hastalanmaları ile görülmüş ve klinik bulguları ile "Kırım Kanamalı Ateşi" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra 1956 yılında ateşi yüksek bir hastanın klinik örneklerinde, o zamanlardaki adı ile "Belçika Kongosu" olarak bilinen hastalık etkeninin, 1969 yılında Kırım Kanamalı Ateşi ile aynı olduğu gösterilmiş ve bu tarihten sonra "Kırım Kanamalı Ateşi-Kongo Virüsü" olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda bugünkü adıyla yani Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi olarak söylenmeye başlanmıştır (2, 26).

Ülkemizde ise ilk kez 2002 yılında Aspartat Amino Transferaz (AST), Alanin Amino Transferaz (ALT), Laktat dehidrogenaz (LDH) yüksekliği, lökopeni ve trombositopenisi olan kanamalı ateş vakaları, Tokat başta olmak üzere Çorum, Sivas, Yozgat illeri ve civarından bildirilmiş ve 2003 yılında hastalığın KKKA hastalığı olduğu doğrulanmıştır (27, 28). 2013 yılı itibariyle ülkemizde yaklaşık 8000 olgu ve 400 ölüm saptanmıştır (29).

2.1.3. Virüsün Yapısı ve Moleküler Biyolojisi

2.1.3.1. Sınıflandırılması

KKKA hastalığı virüsü Bunyavirüs ailesindedir. Bunyavirüs ailesinde Orthobunyavirüs, Hantavirüs, Phlebovirüs, Nairovirüs ve Tospovirüs ve Sınıflandırılmayan Bunyaviridae olmak üzere 6 farklı grupta 300 den fazla virüs bulunmaktadır (Tablo 1, 30).

Tablo-1: Bunyaviridae ailesi (30).

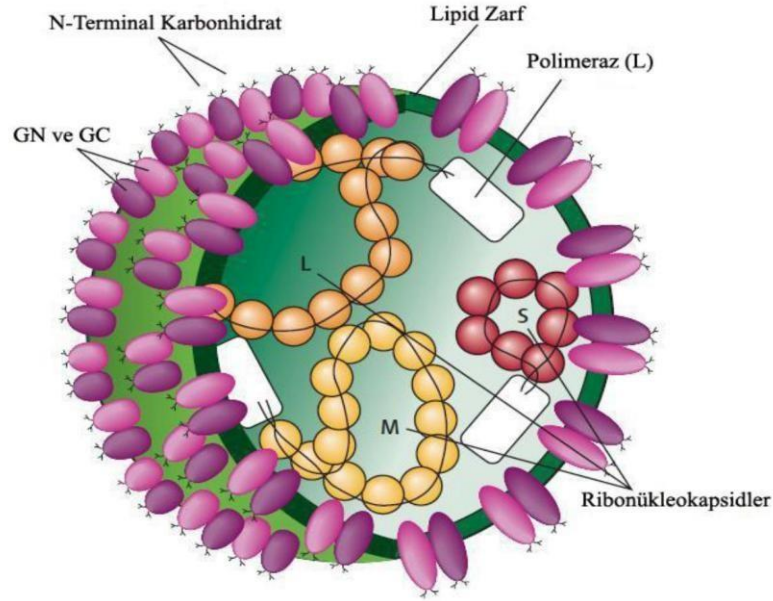
<p><i>Bunyaviridae;</i></p> <ol style="list-style-type: none">1. <i>Bunyavirus</i>2. <i>Nairovirus</i><ol style="list-style-type: none">a. <i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i>b. <i>Dera Ghazi Khan virus</i>c. <i>Dugbe virus</i>d. <i>Hughes virus</i>e. <i>Qalyub virus</i>f. <i>Sakhalin virus</i>g. <i>Thiafora virus</i>3. <i>Hantavirus</i>4. <i>Phlebovirus</i>5. <i>Tospovirus</i>6. <i>Orthobunyavirus</i>
--

2.1.3.2. Yapısı ve Replikasyonu

Nairovirüs grubunda 7 farklı serogruba 34 virüs bulunmaktadır. Bunlar içerisinde KKKAV, KKKA hastalığına neden olmaktadır. Dugbe virüsünün ise koyun ve keçilerde primer patojen olmalarına karşın insanlarda da ateş ve trombositopeni yaptığı gözlenmiştir (31).

Nairovirüsler dayanıksızdır ve konakçı dışında yaşamlarını sürdüremezler. Bu virüsler 56°C'de 30 dakikada inaktive olurken, kanda 40°C'de 10 gün yaşayabilirler. Virüsler %1 hipoklorit, %2 gluteraldehite duyarlıdır ve ultraviyole ışınları ile hızla inaktive olurlar (32).

KKKV bir RNA virüsüdür ve zarf kalınlığı yaklaşık 5-7 nm (nanometre) 'dir. Virüsün çapı 80-120 nm'dir. Genomu tek zincirli, helikal ve sirküler yapıda, üç parçalı (L,M,S) ve negatif polariteli bir yapıya sahiptir (Şekil-1 2, 33). Yüzeyinde yaklaşık 8-10 nm uzunluğunda iki glikoprotein çıkıntı bulunmaktadır (Gn ve Gc). Bunlar eritrositleri hemaglutine etme özelliğinde olup, virionun tutunmasından ve nötralizan antikorların indüksiyonundan sorumludurlar (34).



Şekil-1: Bunyaviridae viriyonunun kesitsel görünümü (2)

KKKAV genomu, Bunyaviridae ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi üç negatif polariteli Large (L), Medium (M) ve S (Small) RNA segmentinden oluşmaktadır.

• **L (Large) Segment:** Viral RNA bağımlı RNA polimerazı kodlar.

• **M (Medium) Segment:** İki önemli yüzey glikoproteini olan Gc ve Gn'yi kodlar. Bunlar virüs zarfında bulunan çıkıntı şeklinde yapılardır, konak hücreye tutunma ve hücre içine girişi sağlarlar.

• **S (Small) Segment:** Yapısal protein olan nükleokapsit proteinini (NP) kodlar. Bu protein RNA segmentleri ile kompleks yaparak RNA'yı korur. Virüs polimerazı ile birlikte replikasyon ve viral transkripsiyonda da görev alır.

Small, Medium ve Large ribonükleokapsidlerinin her biri infektivite için bir virionda bulunmalıdır. (35). Glikoproteinlerin, hedef hücrelerin reseptör bölgelerinin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Reseptörlere yapışan virüsler, endositoz ile içeri alınırlar ve replikasyon sitoplazmada meydana gelir. Virionlar endoplazmik retikulum üzerinden golgi bölgesinde sitoplazma içi veziküllere tomurcuklanırlar ve bunlar virüsü salmak için sitoplazma membranı ile birleşirler (33).

2.1.3.3. Türleri ve Filogenetik ilişkiler

Nükleik asit sekans analizine dayanan çalışmalarda KKKAV'nin genetik farklılıkları ortaya konulmuştur. M segment analizlerine göre 8, L segment analizlerine göre 6 ve S segment analizlerine göre 6 türü olduğu gösterilmiştir. Türkiye'de son dönemlerde izole edilen virüs türleri, Güneydoğu Rusya'daki ve Kosova'daki KKKA virüsü türüne çok benzemektedir (33).

2.1.5. Epidemiyoloji

VKA içerisinde dünya coğrafyasında en yaygın olarak görüleni KKKA'dır ve 30'un üzerinde ülkede görülmüştür (2). Hastalık ilk kez Kırım bölgesinde 1945'te keşfedildi ve günümüzde (Amerika ve Avustralya kıtaları haricinde) Orta Doğu, Asya, Güney Doğu Avrupa, Afrika'da da tespit edilmiştir. KKKAV kene kaynaklı olup, bu kenelerin yaygın dağılımı ile doğrudan ilgilidir ve geniş bir coğrafyayı etkilemektedir (36, 37). Günümüze kadar eski Sovyetler Birliği, Bulgaristan, Pakistan, Irak, Dubai, Kuveyt, Birleşik Arap Emirlikleri, Büyük Sahra'nın güneyindeki Afrika ülkeleri ve Kuzey Batı Çin'de epidemiler yaptığı bildirilmiştir (38). Bilinen ilk salgın 1965 yılında Çin'de meydana gelmiştir ve % 80 fatalite görülmüştür (39).

Ülkemizde başta Tokat, Sivas, Yozgat, Çorum olmak üzere en çok orta anadolu bölgesinde görülmektedir. Ülkemizde serolojik olarak KKKA bildirimleri 2002 yılı ve sonrasında belirgin bir artış göstermektedir. KKKA görülen vakalar, sıklıkla tarım ve hayvancılıkla uğraşan, aktif çalışma yaşında keneye maruz kalma oranı yüksek olan popülasyonda yoğunlaşmaktadır. Ülkemizde görülen salgında vakaların çoğunluğu (83 olgu, % 90'ı) çiftçiydi ve vakaların % 60'ında ateş başlamadan önce bir kene ısırığı öyküsü vardı.

En fazla etkilenen ikinci grubu sağlık çalışanları oluşturmaktadır (8-10). Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre 2002– 2009 yılları arasında 4453 vaka görülmüş, toplam ölüm sayısı 218 dir. (Tablo 2, 40).

Tablo-2: Türkiye’de 2002-2009 yılları KKKa hastalığı vaka ve ölüm sayıları (40)

Yıllar	Vaka Sayısı	lm
2002-2003	150	6
2004	249	13
2005	266	13
2006	438	27
2007	717	33
2008	1315	63
2009	1318	63
TOPLAM	4453	218

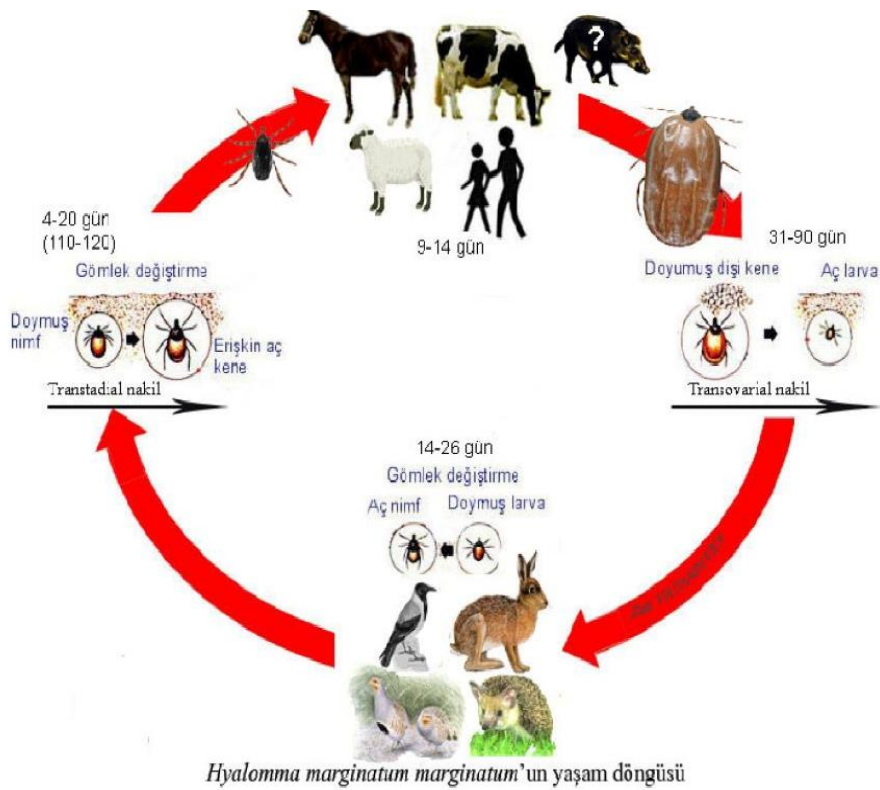
KKKA virüsünün yaygın vektörü Hyalomma genusu keneleridir. Akdeniz Hyalomması olarakta bilinen Hyalomma marginatum marginatum muhtemelen Avrupa’daki asıl KKKAV vektörüdür. Virüs insanlara hem Hyalomma kenelerinin, hem de enfekte evcil hayvanların doğrudan teması ile yayılır. KKKAV yayılım döngüsü başlıca keneleri, vahşi ve evcil hayvanları içermesi bakımından öncelikle bir zoonozdur. Sığır, koyun ve keçiler enfeksiyondan sonra hastalanmazlar fakat bir hafta viremik olurlar. Virüs bu periyod boyunca bu hayvanlar ile teması olan tarım çalışanlarına, veterinerlere ve mezbaha işçilerine bulaşabilir, tarım çalışanları birinci derece risk altındadır. Ayrıca virüs, enfekte ticari hayvanlar ile de diğer coğrafi bölgelere yayılabilir. Deneysel olarak virüs ile enfekte edilmiş devekuşlarında, hiçbir hastalık semptomu görülmemesine karşın virüs, kan, karaciğer, dalak ve böbrekten izole edilmiştir. Öncelikle hastane ortamlarında insandan insana virüsün yayılımı olabilir. Tarım çalışanlarından sonra ikinci olarak sağlık çalışanları da en çok risk altında olan kesimdir (2, 33, 41, 42).

Hastalık lkemizde özellikle mart-nisan aylarında görülmeye başlayıp mayıs, haziran, temmuz ve ağustos aylarında en fazla görülmektedir. Hastalığın lkemizde erkek ve kadın cinsi arasında benzer oranda olduğu görülmüştür (31).

2.1.5. Bulaşma ve Risk Gurupları

KKKAV, evcil ve yabani hayvanları kenelerin ısırması ile bulaşır ancak bu hayvanlarda hastalık belirtisiz seyrederek. Bundan dolayı koyun, keçi, sığır gibi çiftlik hayvanları, kurt, tilki, gibi yabani hayvanlar, kemirici yabani hayvanlar ile keneler hastalığın doğal rezervuarlarıdır (43, 44). Ayrıca, keneler için bir diğer konak grubunu kuşlar oluşturmaktadır. Devekuşları dışındaki kanatlı hayvanların birçoğu enfeksiyona karşı dirençlidir ve yabani kuşların mevsimsel göçü virüsü kıtalar arasında taşıyabilmektedir (45).

Hastalık etkenini taşıyan kene türleri içerisinde hastalığı bulaştırmada en etkin olanı *Hyalomma marginatum marginatum* cinsi kenelerdir (45). Akdeniz *Hyalomma* olarak bilinen *Hyalomma marginatum marginatum* muhtemelen Avrupa'daki asıl KKKAV vektörüdür. *Hyalomma* cinsine ait olan bu keneler, küçük omurgalılarından kan emerken virüsleri alır, gelişme evreleri vücutlarında tamamlanan virüsleri insan veya hayvanlardan kan emerken bulaştırırlar (2). *Hyalomma marginatum*'un yaşam döngüsü Şekil 2'de gösterilmiştir (46).



Şekil-2: *Hyalomma marginatum*'un yaşam döngüsü (46).

İnsanlara hastalığın başlıca bulaşma yolları;

Kene ile Bulaşma: Kene tutunması başlıca bulaş yoludur. Ülkemizde Başol N ve ark. yaptıkları bir çalışmada kene ısırması ile acil servise başvuran 251 hastanın %25.1'inde KKKKA tanısı konmuştur. Hayvanlardan kene temizlerken kenenin parçalanması, ezilmesi sonucu kenedeki virüs cilt bütünlüğünün bozulduğu yerlerden veya mukozal temasla insanlara bulaşabilir.

Enfekte Hayvanlardan Bulaşma: Viremik dönemde enfekte hayvanların kanı ile temas eden insanlara bulaş mümkündür. Enfekte hayvanın enfekte dokuları ile temas sonucu hastalık gelişebilir. Enfeksiyon bulaşmış hayvanların yenmesi riskli değildir, çünkü virüsler hayvanların kesilmesinden sonra dokularda meydana gelen asidemi ile inaktive olurlar ve pişirilmeden etkilenirler.

Hasta İnsandan Bulaşma: Kan ve vücut sıvıları ile temas, enfekte dokudan, mukozal temas, anne sütü ile bulaş ve yüksek riskli ev içi yakın temas sonucu hastalık bulaşabilir (24, 33, 45,47).

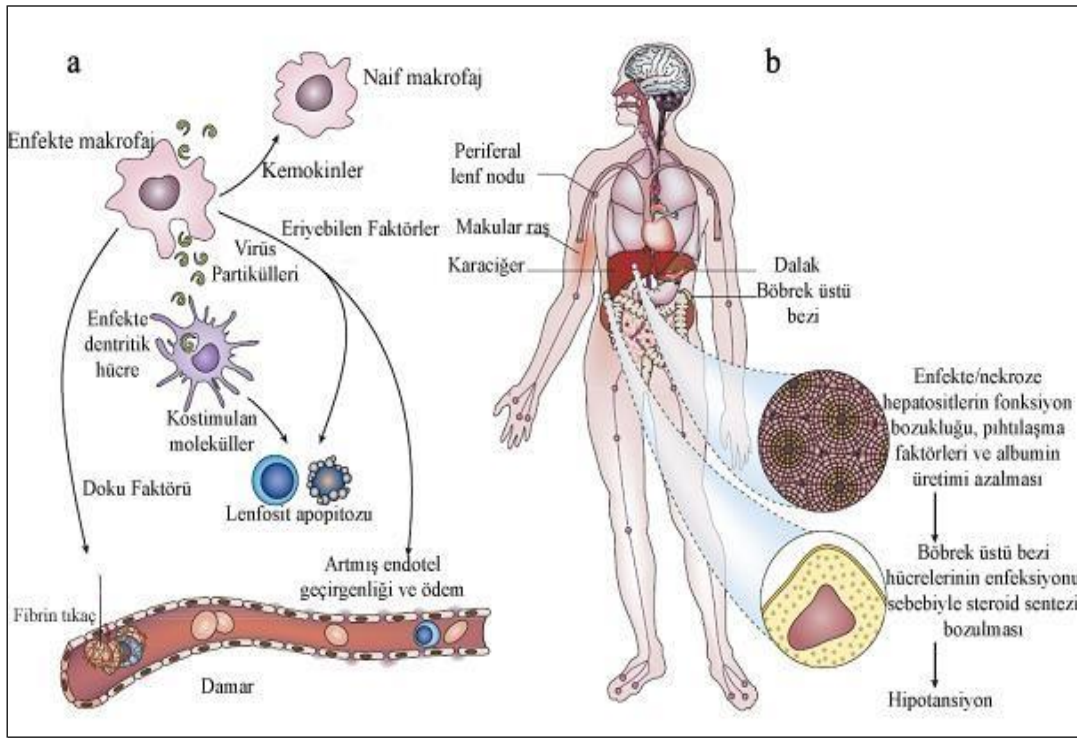
Zoonotik bir hastalık olan KKKAH için risk grupları; çiftçiler, hayvancılıkla uğraşanlar, çobanlar, veteriner hekimler, mezbahanedeki çalışanlar, hasta hayvan ve kene ile teması olanlar, askerler ve kamp yapan insanlar yüksek risk altındadır (43). Sağlık çalışanları özellikle hastalarda meydana gelen kanama odaklarına müdahale esnasında enfekte olmaktadır. İnvazif girişim ve cerrahi operasyonlar sırasında oluşan yaralanmalar ve laboratuvar ortamındaki bulaşma diğer sık nedenlerdir (2).

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 (9, 44). Sağlık çalışanları en fazla etkilenen ikinci gruptur (2). Sağlık çalışanlarına hastalığın bulaşmasını önlemede en etkili yol hastanede üniversal infeskiyon kontrol önlemlerinin alınmasıdır (45).

2.1.6. Patogenez

KKKKA patogenezi diğer VKA'lere benzemektedir (3). VKA'nın hastalıklarda patogenezi şekil-3'te özetlenmiştir (48). Bulaş yollarıyla vücuda giren virus deride, derialtı dokusunda ya da bölgesel lenf bezlerinde çoğaldıktan sonra kana geçer. Başta retiküloendotelial 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 virüsün direkt etkisinden çok virüsün salınımının neden olduğu proinflamatuvar sitokinlerce oluşturulduğu düşünülmektedir (3, 33). Endotel hasarı intrinsek koagülasyon kaskadını aktifler, trombosit adezyon ve agregasyonunu artırır ve sonuçta dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) gelişir. Multiorgan yetmezlik sendromu (MODS) ve yaygın kanamalar ortaya çıkar (3, 49). Ayrıca, ölen hastalarda sağ kalan hastalara göre serum interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) düzeylerinin daha fazla olduğu saptanmıştır (50).



Şekil-3: Viral kanamalı ateş hastalıklarında patogenezi (48)

Türkiye’den bildirilen olgularda reaktif hemofagositozun (kemik iliğinde trombosit ve eritrositlerin fagosite edilmesi) KKKA’nın patogeneziinde özellikle önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (44, 51, 52).

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'nin patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Koagülasyon faktör düzeyleri, antikoagülan protein değişiklikleri ve hastalardaki fibrinolitik sistem değişiklikleri sınırlı sayıdaki çalışmalarda araştırılmıştır (19-21).

2.1.7. Klinik Bulgular

KKKA enfeksiyonunda klinik seyirde dört ana bölüm görülmektedir.

Bunlar: inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvalesan dönemdir (37).

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 virüs soyuna veya viral doz gibi diğer faktörlere bağlı olabileceği varsayılmaktadır (33).

2) Prehemorajik Dönem: 1-7 gün sürer ve baş ağrısı, aniden başlayan ateş (39-41°C), baş dönmesi, miyalji ile karakterizedir. Ateş 4-5 gün kadar devam edebilir. İshal, bulantı ve kusma diğer bulgulardır. Prehemorajik dönemde vücut üst bölgelerinde hiperemi, konjonktivit görülebilir (3, 37).

3) Hemorajik Dönem: 2-3 gün kadardır ve hastalığın genellikle 3. veya 5. günlerinde başlar. Hastaların büyük çoğunluğunda hastalık başladıktan sonraki 5-7. gün içinde kanama gelişir. Kanamalar deride ve müköz membranlarda görülen peteşiler ile büyük hematomlar arasında değişir. En sık görülen kanamalar, gastrointestinal sistemde hematemez, melena ve intra-abdominal kanamalar, genitoüriner sistemde hematüri ve solunum yollarında ise hemoptizi şeklinde olanlardır (3). Oblik kas, çekum gibi alışılmadık kanamalar da görülebilir, apandisiti taklit eden olgular bildirilmiştir. Kanamanın başlaması ve ateş yüksekliği arasında ilişki yoktur. Hastaların 1/3 ünde karaciğer ve dalak büyüklüğü bildirilmiştir (2).

4) Konvalesan Dönemi: 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 (2). Hepatorenal yetersizlikler Güney Afrika'da bildirilmesine rağmen Türkiye'de

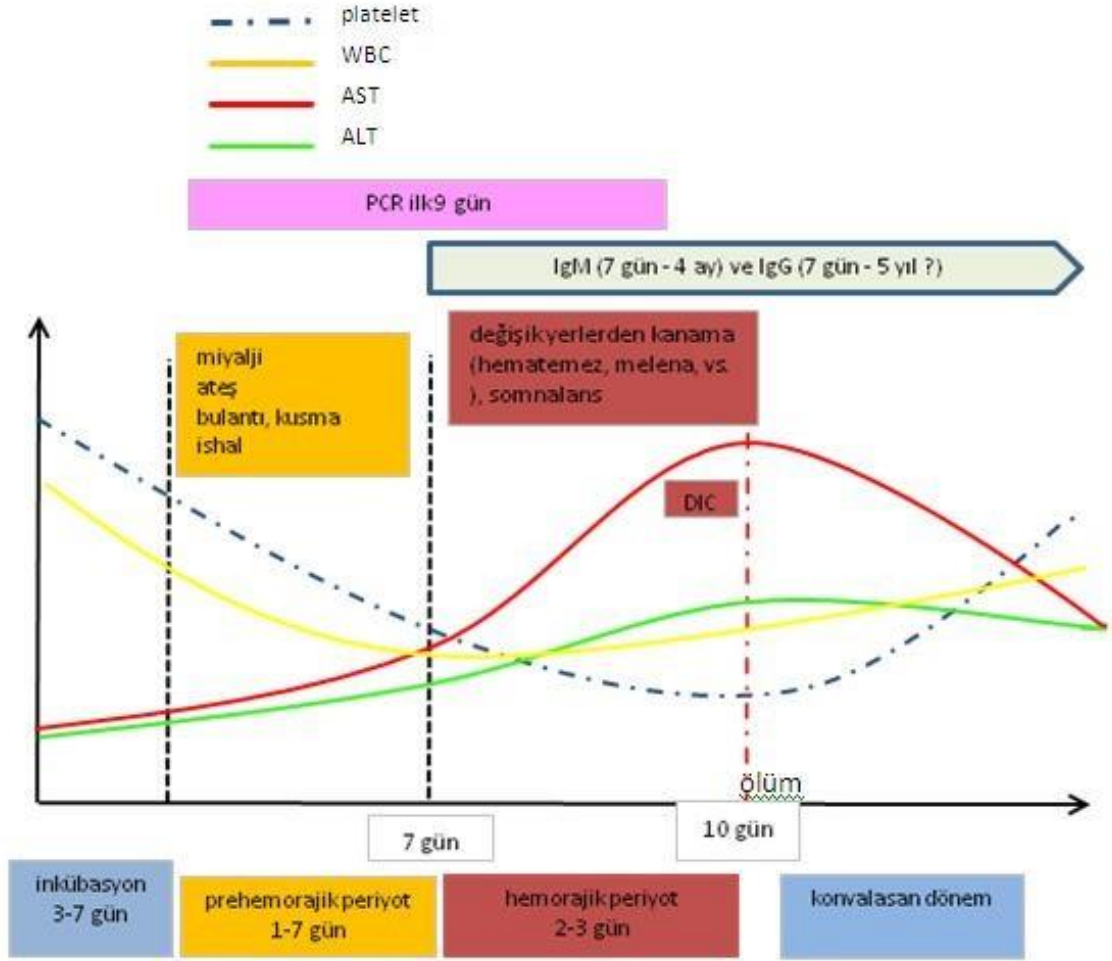
görülmemiştir (44). Hastalık geçirenlerde koruyucu bağışıklık gelişmektedir. Hastalığın bifazik seyri Sovyetler Birliği'nde yayınlanmış, ancak Türkiye'de görülmemiştir (2).

Tablo-3: Türkiye'den bildirilen KKA olgularında belirti ve bulgular (53)

Belirti ve Bulgular	%
Bulantrı-kusma	80
Miyalji	70
Ateş	75
Başağnsı	75
Kanamalar	48
Epistaksis	40
Hematemez	26
Hematüri	16
Melena	14
Hemoptizi	8
Konjonktivada kızarıklık	42
Makülopapüler döküntü	35
Hepatomegali	35
Ishal	34
Uyku hali	20
Sarılık	10
Splenomegali	10
Lenfadenopati	15

2.1.8. Laboratuvar Bulguları

KKAH'da laboratuvar bulguları arasında trombositopeni enfeksiyonun değişmez bulgusudur. Hastalarda lökopeni, ALT, AST, LDH ve kreatinin fosfokinaz (CPK) yükseklikleri de görülür. Protrombin zamanı (PT) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) gibi hemostaz testleri uzamıştır. Fibrinojen düzeyi düşebilir, fibrin yıkım ürünleri artabilir. Tam kan sayımı ve biyokimya testleri dahil olmak üzere tüm laboratuvar testleri sağ kalan hastalarda yaklaşık 5-9 günde normal sınırlarına döner (54).



Şekil-4: KKKK'nın klinik ve laboratuvar seyri (2)

2.1.9. Tanı

2.1.9.1. Non-Spesifik Laboratuvar Testleri

Trombositopeni KKKK'nin en sık saptanan laboratuvar bulgusudur. Hastaların lökopenisi de vardır. AST, ALT, LDH ve CPK değerleri yükselmiştir. Hastaların bir kısmında PT, APTT ve INR (international normalization ratio) gibi kanama testleri uzamıştır (2, 33).

2.1.9.2. Virüs İzolasyonu

Virüsün izolasyonu veya kültürüne yönelik çalışmalar mutlaka dördüncü biyogüvenlik düzeyi olan laboratuvarlarda yapılmalıdır. KKKA virüsünün kültürü için geleneksel metod, yenidoğan fareye beyin içi veya periton içi virüs inokülasyonudur. İnokülasyon sonrası virüs ile hastalanan fareler 4-6 günde ölürlür (55).

2.1.9.3. İmmünolojik Yöntemler

KKKAV enfeksiyonunun serolojik tanısı nükleoprotein antijenine karşı immun cevap olarak üretilen spesifik IgM ve IgG antikörlerinin tespiti esasına dayanır (2, 31). Hastalığın başlamasından 7 gün sonra Enzim Bağlı İmmunosorbent Test (ELISA) ve İndirekt Floresan Antikor (IFA) testleriyle IgM ve IgG antikörleri saptanabilir (56). IgM en erken dördüncü günde tespit edilmiştir (57). ELISA metodu, immünofloresan yöntemler ve nötralizasyon antikor testlerine göre oldukça özgül ve duyarlıdır (2).

2.1.9.4. Moleküler Yöntemler

Dolaşan virüs ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile saptanabilir (58). 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 Konvansiyonel RT-PCR yöntemindeki ilerleme, otomatize real-time PCR çalışmalarını geliştirmiştir. Real-time PCR çalışmasının, konvansiyonel PCR metoduna göre pek çok avantajları vardır. Bunlar düşük kontaminasyon riski, hızlılık, yüksek duyarlılık ve özgüllüktür. Saatler içinde sonuç alınabilir (33).

2.1.10. Ayırıcı Tanı

Ayırıcı tanı coğrafi bölgeler göre değişmekle birlikte bakteriler, virüsler ve enfeksiyon dışı etkenleri kapsar (Tablo 4). Akciğer tutulumu, ensefalit benzeri klinik tablolar ön planda değildir. Ayrıca, bu hastalarda ateş ve hastalık gelişimi ani olduğundan hastalık öyküsü 2-3 haftayı bulan hastalarda tanıdan uzaklaşılır. Bu nedenle KKKA, sebebi bilinmeyen ateşli hastalıkların klasik tanımını içinde yer almaz (53).

Tablo-4: Ayırıcı Tanı (53)

<i>Hastalık</i>	<i>Ayırıcı tanı</i>
Enfeksiyonlar	
Bruselloz	Pansitopeni, Wright
Q ateşi	Seroloji (ELISA veya IFAT)
Riketsiya	Weil-felix testi
Erlhiyoz	Seroloji (ELISA)
Hanta	Pulmoner veya renal tutulum, seroloji, PZR
Diğer kanamalı ateşler	
Ebola	Coğrafi bölge
Marburg	Coğrafi bölge
Leptospira	Aglutinasyon
Salmonella	Widal testi
Flebovirusler (Tatarcık humması)	
Enfeksiyon dışı nedenler	
Vitamin B12 eksikliği	Pansitopeni ve serumda B12 düzeyi
Febril nötropeni	Altta yatan hastalık
İlaç yan etkileri	
Metamizol	Öykü

2.1.11. Tedavi

Destek Tedavisi: KKKA'da tedavinin temelini trombosit süspansiyonu, taze donmuş plazma ve eritrosit süspansiyonu gibi kan ürünleri ile destek tedavisi oluşturmaktadır (2,59). Hastalar, hemodinamik yönden yakın takip edilmeli, sıvı ve elektrolitler dikkatle izlenip eksik olan parametreler yerine konmalıdır. Kardiyotonik, vazopressörler ve sedatifler ihtiyaç halinde kullanılabilir (60). Olası kanama odaklarının kontrolü yapılmalı, mecbur kalınmadığı sürece kanama oluşturabilecek intramüsküler enjeksiyonlardan ve pıhtılaşma sistemini etkileyecek ilaç kullanılmasından uzak durulmalıdır (2).

Antiviral İlaç Tedavisi: KKKA'da etkinliği tartışılan ve günümüzde hastalığın özgül tedavisinde kullanılmakta olan tek ilaç ribavirindir. Bazı *in vitro* çalışmalarda hücre kültürü ortamında ribavirinin virüs replikasyonunu durduğu tespit edilmiştir (59). Ayrıca ribavirinin

ölüm oranını düşürdüğüne dair birçok bildiri vardır. Ciddi KKKAH olan vakalarda oral ribavirin tedavisinin faydasının olmadığı, mutlaka parenteral kullanılması gerektiğini söyleyen araştırmacılar vardır (61). Hemolitik anemi, döküntü, kaşıntı, öksürük, uyku bozukluğu ve depresyon ribavirinin yan etkileridir. Gebelerde kullanımı kontrendikedir. Embriyotoksik ve teratojenik etkileri bulunmuştur ancak gerekli görüldüğünde erişkin dozu verilebilir (2, 56, 62-64).

Hiperimmün Serum Tedavisi: İyileşen ve bağışıklık gelişen hastalardan elde edilen immün serum ile yapılan pasif immünizasyonun hastalığın erken döneminde kullanılmasının faydalı olabileceği izlenimleri mevcuttur (60, 65).

Hastaların kan ve kan ürünleriyle parenteral temas söz konusu olduğunda profilaktik olarak günde dört defa 500 mg oral ribavirin 7 gün süreyle verilmesi önerilmektedir (23) ve temas eden kişinin en az 2 hafta süreyle ateş ve diğer belirtiler açısından izlenmesi gerekmektedir (65).

2.1.12. Korunma ve Kontrol

KKKA hastalığını bulaştıran vektör kenelerden ve bunların yoğun yaşadığı kırsal alanlardan uzak durmak en önemli tedbirdir. Kene kovucu repellentler; N,N-dietil-metatoluamid (DEET) ve permetrin kullanılabilir. Hastane personelinin bulaştan korunmasında universal önlemler (önlük, eldiven, maske, gözlük vs) alınmalıdır (27, 33, 66).

Mümkün olduğu kadar kenelerin bulunduğu alanlardan (hayvan barınakları, piknik amaçlı gidilen su kenarı, otlak şeklindeki yerler, çalı çırpı ve gür ot bulunan yerler, av alanları, orman gibi) kaçınılması gerekmektedir. Eğer bu tür ortamlarda bulunuluyorsa çıplak ayakla dolaşılmalı veya kısa giysiler giyilmemelidir (lastik çizme giyilmeli veya pantolonların paçaları çorap içine alınmalı), boyuna mendil veya eşarp sarılmalıdır, vücut belirli aralıklarla kene yönünden aranmalı; vücuda yapışmamış olanlar dikkatlice toplanmalı, yapışan keneler ise ezilmeden ve kenenin ağız kısmı koparılmadan (bir pensle sağa sola oynatarak, çivi çıkarır gibi) alınmalıdır (67).

Hastaların kan, tükürük ve diğer vücut sekresyonlarına temas etmemeye dikkat edilmelidir. Böyle bir durum meydana geldiğinde, temas eden kişinin en az 2 hafta süreyle ateş ve diğer belirtiler açısından izlenmesi gerekmektedir (45).

2.2. Trombin

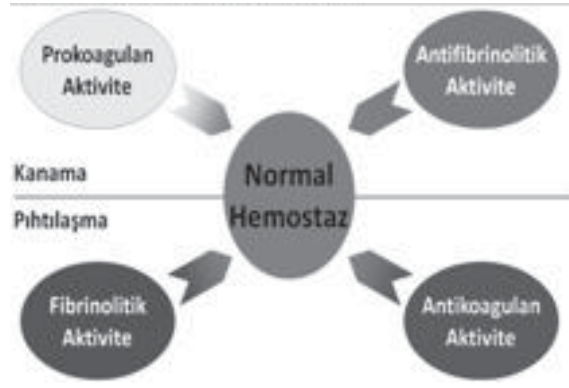
2.2.1. Genel Özellikleri

1872 yılında Alexander Schmidt fibrinojeni fibrine dönüştüren bir enzimin varlığı hipotezini öne sürmüştür. (68). Trombin, protrombinaz kompleks varlığında protrombinden meydana gelen, tripsin benzeri serin proteaz içeren “koagülasyon faktör II” olarak da bilinen iki zincirli bir moleküldür (11). Trombinde yapısal olarak birbirine kovalent olarak tekli disülfid bağı ile bağlanmış iki zincirden büyük olan B zinciri 259 aminoasit içerir; küçük olan A zinciri ise 36 aminoasit içerir (69). Trombinin aktif bölgesi B zincirindedir (70).

2.2.2. Hemostaz

Hemostaz; vücutta aşırı kan kaybını engelleyen fizyolojik bir savunma mekanizmasıdır. Vücuttaki çeşitli onarım ve inflamatuvar süreçler kanamanın durdurulmasını, böylelikle kanın intrvasküler alanda kalmasını sağlar. Bunun yanında hemostaz ayrıca aşırı miktarda pıhtı oluşumunu engelleyen ve kanın akışkanlığını yeniden kazandıran sistemleri de içermektedir (71, 72).

Hemostaz kanın pıhtılaşması ile akışkanlığı arasındaki hassas dengeyi korur. Sağlıklı bireylerde endotel hasarı onarılırken, düşük düzeyde bir koagülasyon yanıtı oluşur. Denge bozulduğunda ise anormal veya istenmeyen koagülasyon yada aşırı kanama ortaya çıkabilir (73) (Şekil 5).



Şekil-5: Hemostatik denge

Vasküler yapının zedelenmesinden hemen sonra hemostatik süreç başlar. Normal bir hemostaz, vasküler endotel yanıt (vazokonstriksiyon), trombotik tıkaç oluşumu ve pıhtılaşma olmak üzere 3 basamakta gelişir. Hemostatik dengenin normal olarak devam ettirilebilmesi için bu basamakların uygun bir biçimde çalışması gerekir. Vasküler endotel yanıt ve trombotik tıkaçın meydana gelmesi primer hemostaz, pıhtılaşma sistemi ise sekonder hemostaz olarak tanımlanır (74, 75).

Damar hasarlanması ile meydana gelen mekanizmalar;

- 1- Vazokonstriksiyon (Vasküler Faz)
- 2- Primer Hemostaz (Trombosit Fazı)
- 3- Sekonder hemostaz (Koagülasyon Fazı)
- 4- Fibrinolizis

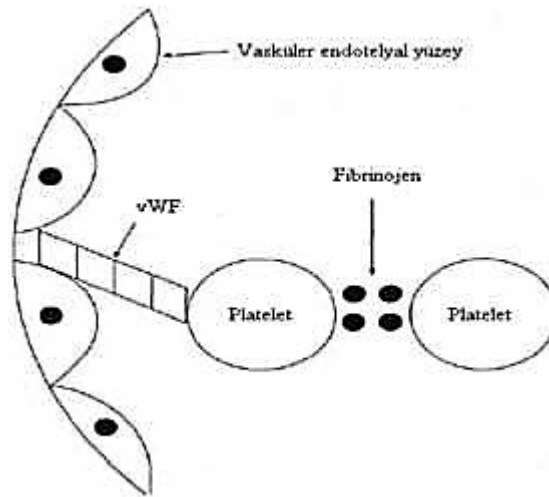
2.2.2.1. Vazokonstriksiyon (Vasküler Faz)

Kan damarı travmaya maruz kaldıktan sonra, hasarlanan damar duvarında miyojenik spazm oluşur. Trombositlerden kaynaklanan bölgesel humoral faktörler ve sinirsel refleksler etkisiyle spazm meydana gelir. Küçük damarlarda vazokonstriksiyonun büyük kısmından tromboksan A2 oluşumunu sağlayan trombositler sorumludur. Damar zedelenmesi büyüdükçe spazmın derecesi de o kadar artar ve bu oluşan spazmın etkisi dakikalar ve saatlerce sürebilir. Bu zaman zarfında trombotik tıkaç oluşur ve kanın pıhtılaşması gelişir (76).

2.2.2.2. Primer Hemostaz (Trombosit Fazı)

Yaralanma yerlerinde trombotik plak oluşum sürecine primer hemostaz denir ve kapiller kanamanın durdurulmasında saniyeler içinde meydana gelen bu hemostatik mekanizma esas önceliğe sahiptir (77).

Trombositler ile vasküler subendotelial dokunun etkileşimi sunucunda, yaralanma alanında trombotik plak oluşur. Bu plağın oluşumu için, normal vasküler subendotel doku (kollajen), fonksiyonel trombositler, normal von willebrand faktör (trombositleri glikoprotein Ib aracılığı ile endotele bağlar) ve normal fibrinojen (trombositleri glikoprotein IIB-IIIa aracılığı ile birbirine bağlar) gerekir (78) (Şekil 6)



Şekil-6: Primer hemostaz (78)

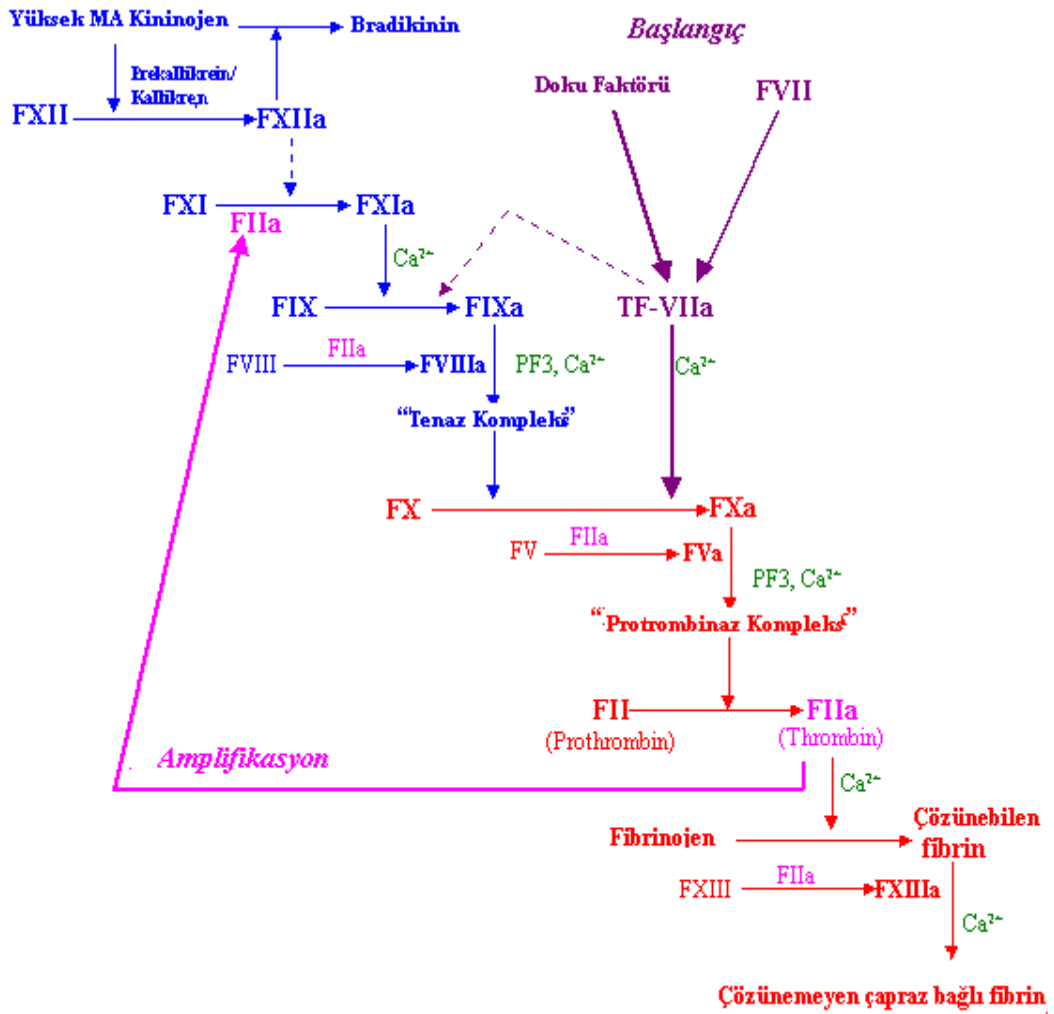
Pıhtının meydana gelmesinde 3 temel aşama vardır; 1-Trombosit adhezyonu (kollajene yapışma), 2-Trombosit sekresyonu ve 3-Trombosit agregasyonu. Vasküler yapının hasarlanmasıyla açığa çıkan kollajenden zengin subendotelial ekstrasellüler doku, trombositlerin yapışması için bir zemin oluşturur. Endotelden serbestleşen von Willebrand faktör (vWF) hasarlanmış bölgeye trombositlerin yapışmasını (adhezyon) kolaylaştırır ve sağlamlaştırır. Subendotelial dokuya yapışarak aktifleşen trombositlerden α ve δ granüller ortama salınır (sekresyon) ve trombositlerin membran iç yüzeyinde bulunan fosfolipidlerle, agregasyon için gerekli olan GpIIb/IIIa reseptörleri açığa çıkar. Granüller tarafından

salgılanan tromboksan A2 (TXA2), endotelin'in başlattığı vazokonstrüksiyonun devamını sağlar. Yine granüllerden ortama salınan Adenozin difosfat (ADP) trombositlerin agregasyonunu uyarırken, kalsiyum ise faktör XII ile başlayan pıhtılaşma sistemini aktifleştirir. Trombosit granüllerinin salınması daha fazla trombositin ortama gelmesini uyararak aktive olmasını sağlar. Aktive olan trombositleri yüzeyindeki GpIIb/IIIa reseptörlerine fibrinojenin bağlanmasıyla trombositler arasında köprüler oluşur ve trombositler birbirine yapışarak birikir (agregasyon). Böylelikle endotel hasarının üzerinde trombotik tıkaç oluşur (72-75).

2.2.2.3. Sekonder Hemostaz (Koagülasyon Fazı)

Koagülasyon sisteminde bulunan faktörlerin aktive olması inaktif formdaki proenzimlerin aktif enzimlere dönüştüğü bir reaksiyonlar zinciridir. Her reaksiyon basamağı bir enzim, substrat ve kofaktörden oluşur. Reaksiyonlarda rol alan bu komponentler fosfolipid kompleksinde toplanır ve kalsiyum iyonuna gereksinim duyarlar. Bu nedenden dolayı tüm reaksiyonlar sadece etkilenen bölgede sınırlı kalır (75, 79). Faktör IV (Kalsiyum, Ca²⁺) dışında koagülasyon faktörlerinin tamamı proteindir ve bunların birçoğu inaktif proenzim (zimojen) olarak kanda bulunur. Faktör V (Proakselerin) ve VIII (Antihemofilik faktör) kemik iliğinde megakaryositler tarafından oluşturulurlar ve enzim yapısında değildirler. Trombositlerin aktivasyonu ile depolandıkları granüller içinden kana salınırlar. Bu faktörler (Faktör V ve VIII) trombinin yapısını güçlendirir (80). Sentezlenmeleri ve fonksiyonları için K vitaminine gerek olan faktörler; Faktör II, VII, IX, X, protein C ve protein S'dir (81). Kan dolaşımında bulunmayan tek koagülasyon faktörü Faktör III (Tissue Factor-TF)'tür. Faktör III subendotelyal alanda bulunur ve doku faktörü olarak bilinir.

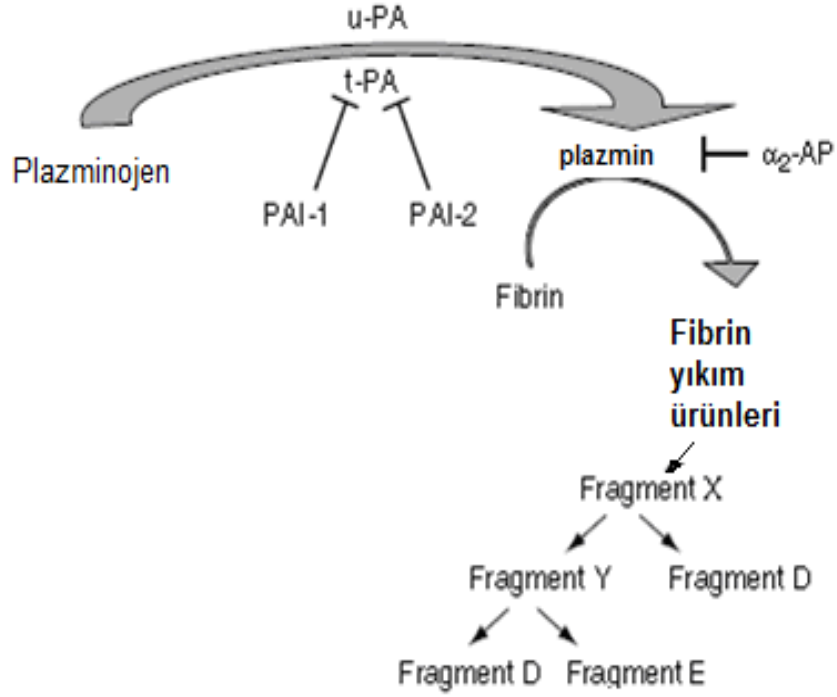
Koagülasyon sistemi, pıhtılaşma faktörlerinin birbirini ardışık olarak aktive ederek oluşan reaksiyonlar bütünüdür. Klasik olarak koagülasyon iki yolla başlatılır; ekstrensek ve intrinsek yol. Ekstrensek yol doku faktörü ile başlarken, intrinsek yol Hageman faktör (faktör XII) aktivasyonu başlar. Her iki yol da sonuç olarak faktör X'u aktive eder ve ortak yol üzerinden stabil pıhtı oluşumunu sağlar. Koagülasyon sistemi bir çok noktada iç içe geçmiş, faktörlerin veya ürünlerin birbirini tetiklediği veya inhibe ettiği, aynı anda tek bir sistem şeklinde çalışır. Aslında koagülasyon olayı reaksiyonlar zincirinden çok bir patlama olarak meydana gelir. Koagülasyon sisteminin birçok noktada birbirine geçmiş yapısının olması sistemin daha iyi kontrol edilebilmesine imkan sağlar (71, 80, 81). (Şekil 7)



Şekil-7: Sekonder hemostazda ekstrinsek ve intrinsek yol

2.2.2.4. Fibrinolizis

Doku hasarı koagülasyon sistemini aktive ettiği gibi fibrinolitik sistemi de aktive eder. Fibrinolitik sistem, biriken fibrini fizyolojik olarak ortadan kaldırılmasını sağlayan bir mekanizmadır. Pıhtı erimesi, plazminin fibrin üzerine olan etkisi aracılığıyla gerçekleşir. Fibrinolitik sistem işlevini yerine getirebilmesi için, plazminin fibrine bağlanması ve trombin tarafından aktive edilmiş plazmin inhibitörlerinden korunmuş olması gereklidir. Plazminojen, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) veya ürokinaz plazminojen aktivatörü (u-PA) tarafından plazmine dönüştürüldükten sonra, fibrin ve fibrinojeni fibrin yıkım ürünlerine parçalar. Fibrinolitik sistem inhibitörlerinden plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve plazminojen aktivatör inhibitörü-2 (PAI-2), t-PA'yı inhibe eder. Plazmin, α 2 antiplazmin (α 2AP) tarafından inaktive edilir (82)



Şekil-8: Fibrinolizis

2.2.3. Trombinin Hemostazdaki Rolü

Trombin geniş bir fonksiyon yelpazesine sahiptir. Primer fonksiyonu hemostatik plak oluşurken fibrinojenden fibrin polimerlerini oluşturmaktır. Trombin, önce fibrinojenden fibrin monomerleri olarak bilinen fibrinopeptid A ve B fragmanlarını koparır ve daha sonra bu monomerlerin birleşmesini sağlayarak fibrin polimerlerini oluşturur. Aynı zamanda Faktör XIII'ü(fibrin stabilize eden faktör) aktive ederek fibrin polimerlerinin çapraz bağlarının oluşmasını ve güçlü bir fibrin pıhtısının oluşmasını sağlar (77).

Trombin en güçlü trombosit aktivatörüdür (83).

Trombinin prokoagülan etkisinin yanında antikoagülan etkisi de vardır. Endotel hücreesindeki kofaktörü trombomodüline bağlanır ve protein C'yi aktive eder (12).

Trombinin ayrıca büyüme faktörü ve sitokin benzeri etkisi de vardır. Bu yüzden ateroskleroz, yara iyileşmesi ve enflamasyonda rolü olabilir (12).

2.3. Apoptozis

Apoptozis, enerjiye bağımlı olarak gerçekleşen ve organizma tarafından düzenlenen hücre ölüm şeklidir (15). İlk defa 1842 yılında Carl Vogt tarafından normal gelişim esnasında hücrelerde meydana gelen ölüm olarak tanımlanmıştır. “Programlanmış hücre ölümü” terimi ilk olarak 1965 yılında, “Apoptozis” terimi ise ilk defa Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında kullanılmıştır (84). Apoptozis büyüme, gelişme ve yaşlanma sürecinde rol almaktadır. Ayrıca dokulardaki homeostatik dengenin korunmasında kritik bir rolü olduğu gibi, fizyolojik olarak fetal hayatta ve erişkin dokularda da önemli bir yeri vardır (15). Apoptozis hücrelerde koruyucu bir mekanizma olarak hastalıklarda, immun reaksiyonlarda veya zararlı ajanlara karşı ortaya çıkar (16-18).

Apoptozis sonucu oluşan apoptotik hücreler bazı dokularda ve hücrelerde devamlı oluşturmaktadırlar ve bu oluşum hayat boyunca devam etmektedir. Bu nedenle ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda dinamik bir denge halinde devam eder ve buda dokuda homeostatik dengenin korunmasını sağlar (16). Apoptozis, erken mitokondriyal değişiklik, hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması, nükleer kırılma, hücre zar şişmesi, kaspaz aktivasyonu, fosfotidilserinin hücre zarı dış yüzeyine çıkması, çekirdek parçalanması ve bunun sonucunda apoptotik cisimciklerin oluşması gibi ard arda birçok morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterizedir (84, 85).

2.3.1. Apoptozis ile Nekroz Arasındaki Farklar

Organizmada devamlı bir denge hali vardır. Bu denge halinin korunması yeni hücrelerin sentez edilirken, mevcut hücrelerin bir kısmının hücre ölümü ile ortadan kaldırılmasıyla sağlanmaktadır. ‘Apoptozis’ ve ‘Nekroz’ olmak üzere iki tip hücre ölümü vardır. (17, 86). Bu iki tip hücre ölümü arasındaki farklar Tablo 5’te yer almaktadır;

Tablo-5: Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar (87-89)

Histolojik Bulgular	Apoptozis	Nekrozis
Hücre	Hücre küçülür, tek tek hücre ölümleri gerçekleşir.	Hücre şişmesi, toplu hücre ölümü gerçekleşir.
Organeller	Sağlamdır.	Hasarlıdır.
Enerji gereksinimi	ATP'ye bağlıdır.	Enerji gereksinimi yoktur.
Hücre zarı	Hücre zarı sağlamdır.	Bütünlüğünü kaybeder,
Nükleus	Kromatin parçalanmış birimler halinde yada şapka biçiminde yoğunlaşmış, nükleolus dağılmıştır.	Nekrozda kromatin, normal dağılımını kaybetmiştir ve kalın kromatin iplikleri halinde olup; nekrozun piknoz, karyoreksiz, karyoliz aşamalarından biri görülür.
Yol açan nedenler	ATP noksanlığına yol açmayan fizyolojik ve patolojik durumlardır.	Toksinler, ciddi hipoksi, açlık, fiziksel ve kimyasal travmalardır.
Doku reaksiyonu	İnflamasyon yoktur. Oluşan veziküler yapılar komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilir.	İnflamasyon vardır, ortamda dejenere hücre kalıntıları bulunur ve bunlar fagositler tarafından alınır.

2.3.2. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis çeşitli yollarla aktive olmaktadır. İntrensek ve ekstrensek (veya öldürücü reseptör) olmak üzere temelde iki tip apoptotik yol tanımlanmıştır. Apoptozisin başka bir yolu perforin/ granzim-A veya B (sitotoksik T lenfosit ve NK hücreleri: perforin/granzim kaynaklı apoptozis) yolunu içermektedir (90).

2.3.2.1. Ekstrensek Yol

Hücresinin yüzeyinde bulunan Fas, Tümör nekroz faktör reseptör (TNFR), ölüm reseptörü 5 (DR5) gibi ölüm reseptörlerine FasL, TNF- α , TNF-ile ilgili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) gibi ölüm sinyallerinin bağlanmasıyla bu reseptörler trimerik bir yapı

kazanırlar. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak intrinsek mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her 2 yolla da aktive olan kaspaz-3 yine Kaspaz aktive edici DNaz (CAD) aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur (91-93).

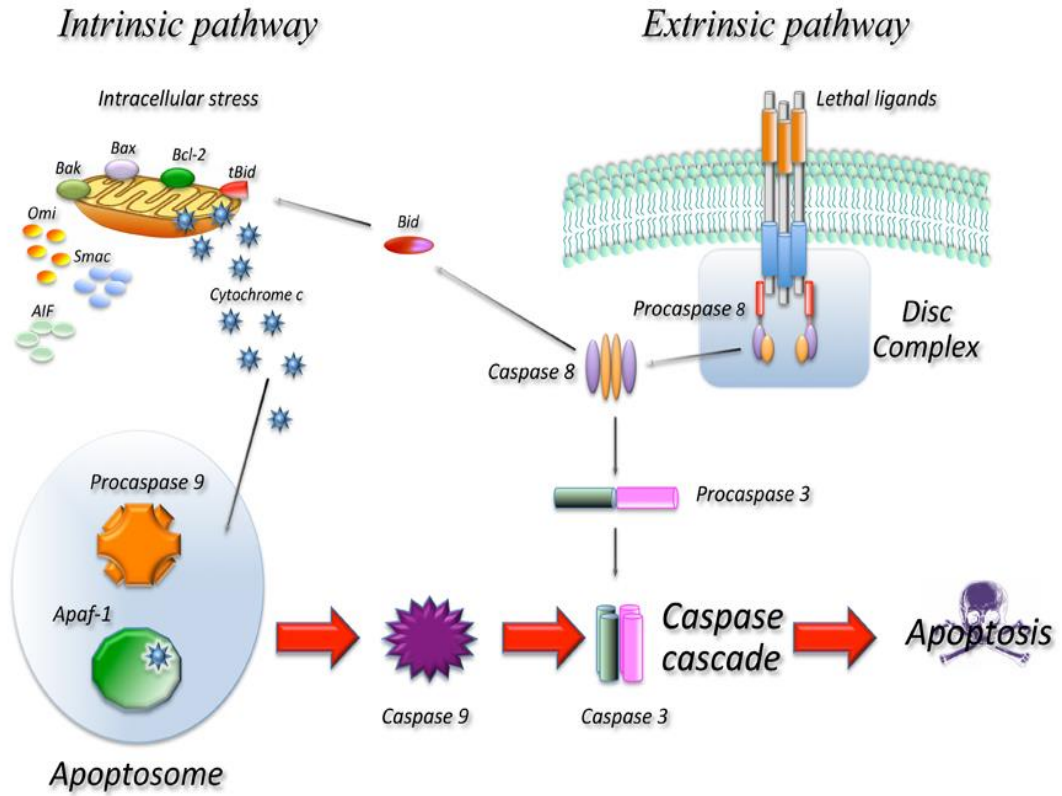
Sfingolipid yolu bir diğer ekstrinsek yoldur. Bu yolda radyoaktivite, kemoterapotik ilaçlar gibi nedenler ölüm reseptörleri aracılığıyla sfingomyelinaz'ı aktive eder. Aktive olan sfingomyelinazda hücre membranının yapı taşı olan sfingomyelinini seramid'e çevirir. Seramidten seramidaz aracılığıyla sfingozin oluşur. Oluşan bu sfingozin Bid yapımını uyararak apoptozisin meydana gelmesini sağlar (94).

Özellikle mikroorganizmalar tarafından enfekte olan hücrelerde ve tümör hücrelerinde görülen Granzim-Perforin sistemi bir diğer apoptotik yoldur. Bu yolda hedef hücreye bağlanan sitotoksik T lenfositler perforin salınmasına neden olurlar. Perforinler ise hücre yüzeyinde por meydana getirir ve hücrenin içerisinde kalsiyum (Ca^{+2}) artışına neden olur, Granzim B serbestleşir. Granzim B kaspazların aktivasyonuna sonrada DNA fragmentasyonu ile apoptozise yol açar (94).

2.3.2.2. İntrensek Yol

Hücre içerisindeki sinyallerin apoptozu uyarılmasından sonra proapoptotik bir protein olan Bid, antiapoptotik Bcl-2'yi inaktif hale getirirken, Bak ve Bax'ın aktifleşmesini sağlar. Aktivite kazanan Bak ve Bax, mitokondri zarında por meydana gelmesini uyarıp membran potansiyelinde değişikliğe neden olur (92). Böylece mitokondri zarındaki porlardan Mitokondri Kaynaklı Sekonder Kaspaz Aktivatörü (Smac), Kalsiyum (Ca^{+2}), Endonukleaz-G, Sitokrom-C (Sit-C) ve Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF) salınmasını uyarır. Smac, IAF (İnhibitör apoptotik factor)'ı inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. IAF'ın ortamda bulunması ise "kaspaz-3" ve "kaspaz-8" in aktive olmalarını engeller. Apoptoz İndükleyici Faktör, nukleusa göç ederek DNA'yı parçalar. Endonukleaz-G'de DNA'yı parçalara ayırır. Sit-C elektron transport zincirinde, oksidatif fosforilasyona elektron taşır. Mitokondri porundan

salınan sit-C, Apoptoz İndükleyici Faktör-1 (APAF-1) ve ATP'nin katılımıyla sitoplazmada "Apoptozom" adı verilen kompleksi meydana getirir (92, 95, 96). Apoptozom kaspaz-9'u aktifleştirirken, kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 inaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'ı inhibe ederek kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı serbestleştirir. CAD nükleusta kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (91, 97, 98)



Şekil-9: Apoptozda temel moleküler yolların şematik gösterimi. (99)

2.3.3. Apoptozisin Düzenlenmesi

Apoptozisin düzenlenmesinde genel olarak rol alan moleküller kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sit-C gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları;

endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alır (100).

Bcl-2 Ailesi: Bcl-2 gen ailesinin heterodimer veya homodimer formuna bağlı olarak hücrenin apoptozise eğilimli olup olmadığı anlaşılır. Bcl-2 gen ailesine ait üyeler 2 gruba ayrılır ve bu grupların etkileri birbirine zıttır;

Proapoptotik üyeler; Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa

Antiapoptotik üyeler; Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1

Apoptozisde rol alan proapoptotik proteinler sitoplazma içerisinde yer alır ve AIF ile sit-C'nin salınımını artırmak yoluyla apoptozisi başlatırlar. Çekirdek zarında, endoplazmik retikulumda ve mitokondri dış membranında bulunan antiapoptotik proteinler ise, hücre içerisinde özellikle kalsiyum gibi iyonların miktarını oluşturdukları porlar sayesinde kontrol ederek iyon transportunu düzenlerler. Bunun yanında prokaspaz, AIF ve sit-C salınımını durdurarak apoptozisi inaktive ederler (91, 92, 95).

P53: Hücrede DNA hasarının meydana geldiği durumlarda bu hasarın onarımı için zaman kazandıran bir transkripsiyon faktörüdür. Bunu hücre siklusunu G1 fazında durdurarak gerçekleştirir. Hücre hasarının onarılamayacak kadar büyük olduğu durumlarda ise Fas Bax, ve Apaf-1 yapımını artırır Bcl-xL ile Bcl-2'yi baskılayarak apoptozisi aktive eder (101).

C-myc: C-myc transkripsiyon düzenleyici bir faktördür. C-myc bulunduğu ortamda büyüme faktörlerinin bulunup bulunmamasına göre hücrede proliferasyon veya apoptozis meydana gelmesine neden olur. Protoonkogen olan c-myc hücrede büyümeyi uyarır. Bir hücrede c-myc ile birlikte gerekli büyüme faktörleri yoksa hücrenin büyümesi durur, her ikisi de yeterince var ise hücrede büyüme meydana gelir. Bir hücrede c-myc var gerekli büyüme faktörleri yok ise apoptozis meydana gelir (102-104).

FAS (APO-1 veya CD95): İmmün sistemdeki sitotoksik T lenfositler ile doğal öldürücü hücrelerin üzerinde yer alan reseptörüne bağlanarak hücre ölümüne neden olur. Fas proteininin molekül ağırlığı 43 kDa'dır ve hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanarak reseptörün trimerizasyonuna neden olur. Böylelikle aktive olan reseptörler Fas-ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) molekülü ile birleşir. Birleşme sonucunda, Fas reseptöründe meydana

gelen uyarılma ile prokaspazlar aktivite kazanır ve apoptozis başlar. TRAIL ve reseptörleri apoptozisi aynı şekilde meydana getirebilir (92, 93).

Mitokondriyon: Kaspaz kaskadında yer alan kaspazların bazıları mitokondride inaktive edilirken, Bax ve Bcl-2 mitokondri dış membranının permeabilitesini ayarlar. Mitokondri iç zarında yerleşmiş ve elektron transport zincirinde görevli olan sit-C, apoptotik uyarıda Apaf-1'i aktive eder ve Apaf-1'i kaspazların aktive edildiği yer olan sitoplazmaya salar. Mitokondriden sitoplazmaya geçen sit-C, hücrede apoptotik yola girildiğini irreversibl bir dönemin başladığını gösterir (105).

Kalsiyum İyonu: Kalsiyum iyonunun rol aldığı olaylar dokulardaki transglutaminazların aktivasyonu, genlerin regüle edilmesi, endonükleaz ve proteaz aktivasyonu ile hücre iskeletinin organizasyonudur (100). Hücreler arası sinyal iletimi kesildiği zaman hücrede apoptozis gözlenir. Sinyal iletim mekanizmasının önemli bir parçası olan Ca^{+2} iyonunun bazı hücrelerde apoptozisi aktive ettiği ve ortamdaki Ca^{+2} iyonunun bloke edildiğinde ise apoptozis oluşmadığı görülmüştür. Bunun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte Ca^{+2}/Mg^{+2} bağlantılı çalışan ve DNA'yı parçalayan endonükleaz enziminin rol aldığı ileri sürülmüştür. Bcl-2 gen ürünü olan proteinin mitokondriyon membranında lokalize olması onun hücredeki Ca^{+2} oranını kontrol edebileceğini göstermiştir, çünkü mitokondriyonlar hücredeki Ca^{+2} depo yeridir (106).

Kaspazlar: Memeli hücrelerinin çoğunda sitoplazmada inaktif proenzim formunda bulunan kaspazlar, bir kez aktive olunca proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirerek proteaz kaskadının (şelale tarzı reaksiyon dizisi) başlamasını sağlarlar (16). Sistein proteaz ailesinden olan kaspazlar "c-asp-ases" ismini, proteinleri "aspartik asit" yer alan bölgelerinden kesmeleri nedeniyle almışlardır. Böylelikle kaspazlar sınırlı proteoliz yapar, buda hücrede lizis olmadan apoptotik cisimciklerin meydana gelmesine neden olur ve apoptotik morfolojinin oluşumunda rol oynar (88). Tanımlanmış 14 major kaspaz, amino asit dizilimlerindeki benzerliğe dayandırılarak işlevselliklerine göre üç alt grupta sınıflandırılırlar:

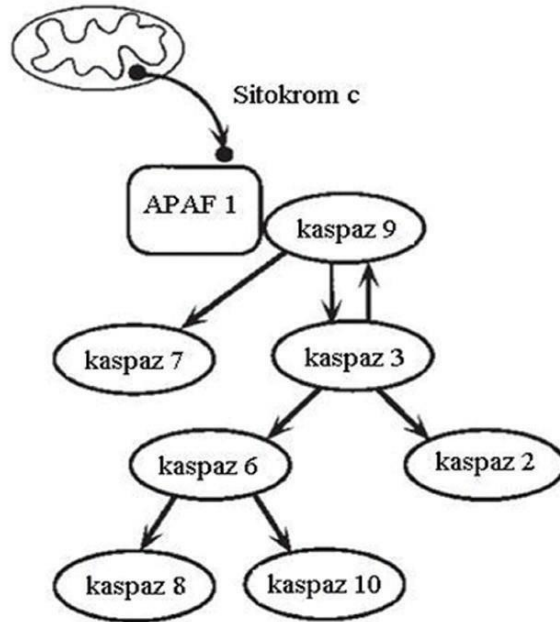
Başlatıcı Kaspazlar; Kaspaz 2,-8,-9,-10

Etkili (Efektör) Kaspazlar; Kaspaz 3,-6,-7

İnflamatuar Kaspazlar; Kaspaz 1,-4,-5,-11,-12,-13,-14

Kaspaz aktivasyonu, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu veya mitokondriyondan salıverilen sit-C'nin APAF-1'i indüklemesi ve prokaspaz 9'a bağlanması ile gerçekleşir (107).

Kaspazlar tetrapeptit motifleri aminoasit spesifitelerine göre tanır ve P4 pozisyonundaki aminoasitlere göre üç spesifik gruba ayrılır. Grup 1 kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5, 13) P4 pozisyonunda hidrofobik aminoasitleri tanır ve sitokinlerin maturasyonuna aracılık ederler. Grup 2 kaspazların yeğledikleri ayırma noktası hücre ölümü sırasındaki pek çok proteinlerde gözlenir ve bununla ilişkili olarak da grup 2 kaspazlar (kaspaz-2, 3, 7) apoptozisin major efektörleri olarak bilinirler. Grup 3 kaspazlar (kaspaz-6, 8, 9, 10) ise P4 pozisyonunda alifatik aminoasitleri tanır ve grup 2 kaspazların aktivasyonunda görev alır (108). Kaspaz inhibisyonu apoptozis inhibitör proteinleri (IAP) ailesine ait proteinler ile gerçekleşir (109).



Şekil-10: Kaspaz Kaskad Aktivasyonu (110).

Deneyisel çalışmalarda kaspazların herhangi birinin varlığının hücrel apoptozise neden olması normal şartlarda kaspazların sıkıca kontrol edilmesi gerektiğini gösterir. Bir veya daha fazla kaspaz enzim aktivasyonu kaçınılmaz olarak apoptozisle sonuçlanacak diğer proteazların aktivasyonuna yol açtığı düşünülür (111).

2.3.4. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Yapılan araştırmalarda; dokularda ve vücut sıvılarında apoptozun saptanması fizyolojik ve patolojik süreçlerin tanı ve takibinde büyük önem taşımaktadır (112).

Apoptozisin tespit edilmesinde kullanılan yöntemler şunlardır;

- 1-Morfolojik görüntüleme yöntemleri,
- 2-İmmünohistokimyasal yöntemler,
- 3-Biyokimyasal yöntemler,
- 4-İmmünolojik yöntemler
- 5-Moleküler biyoloji yöntemleridir (113).

2.3.4.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

Işık Mikroskobu Kullanımı (Hematoksilen veya Giemsa ile boyama): Apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Nükleer kondansasyon ve apoptotik cisimcikler gözlemlenebilsede ışık mikroskobu apoptotik değişikliklerin saptanmasında çok yeterli bir yöntem değildir. Floresan boya (propidium iyodür, Hoechst) kullanılarak etkinliği artırılabilir. Ancak apoptozdaki geç değişikliklerin saptanmasında faydalıdır (114, 115).

Floresan Mikroskobu: DNA'ya bağlanan floresan boya hücrenin kromatinini dolaylı olarak hücre çekirdeğinin görünür olmasını sağlar. Canlı ve ölü hücre ayırımı yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. propidium iyodür) beraber kullanılır. Kromatin kondensasyonu veya nükleus fragmentasyonu olan hücrelerin apoptotik hücreler olduklarını düşündürür (113).

Elektron Mikroskobu: Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptozda en değerli yöntemdir. Hücredeki patolojik değişimlerin gözlemlenmesine imkân tanır. Nekroz ve apoptozun ayırt edilmesinde altın standarttır. Erken ve geç apoptotik değişiklikleri saptamak gibi önemli bir avantajı da vardır (116).

2.3.4.2. İmmünohistokimyasal Yöntemler

Anneksin V Yöntemi: Apoptozise giden hücrelerde normalde hücre membranının iç yüzünde yer alan “fosfatidil serin” hücre membranının dış yüzeyine transloke olur. Dış yüze transloke olan fosfatidil serin, çeşitli boylarla işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Anneksin V; fluoresan boya (örneğin FITC) ile konjuge edilerek fluoresan mikroskopunda gözlemlenebilir. Bu yöntem fosfatidil serinin dış yüze translokasyonu gibi apoptozdaki erken değişikliğin saptanmasına olanak verir. Bu yöntemin dezavantajı ise nekrotik hücrelerinde zaman zaman işaretlenebilmesinden dolayı spesifitesinin düşük olmasıdır (117, 118).

TUNEL Yöntemi (The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-dUTP Nick End Labeling): Terminal deoksiribonükleotid transferaz (TdT)'in DNA kırıklarının 3' ucuna bağlanması ve böylece DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlayan yöntemdir. TdT; biyotin veya fluoresan boya ile kompleks oluşturmaktadır. İşaretlenmiş uçlar ışık veya fluoresan mikroskopunda, immünohistokimyasal olarak veya akış sitometride apoptozis göstergesi olarak saptanabilir (119).

ISEL Yöntemi (In Situ End-Labeling): TUNEL yönteminin modifikasyonu ile oluşturulmuştur. DNA kırıklarının 3' ucu bu kez DNA polimeraz I ile işaretlenir. Bu yöntem, TUNEL yöntemine göre daha az duyarlıdır ve daha zaman alıcıdır (114)

M30 Yöntemi: Apoptotik hücrelerde, “sitokeratin 18”in kaspaz etkisiyle ortaya çıkan “antijenik bölgesinin” immünohistokimyasal yöntem ile boyanarak ortaya çıkarılması prensibine dayanır. Bu yöntem yalnızca sitokeratin 18'i sunan dokularda (Epiteyal kaynaklı dokular gibi) kullanılabilir (113, 120).

Kaspaz-3 Yöntemi: Bu yöntemde yalnızca apoptotik hücrelerde meydana gelen “aktif kaspaz-3” (immünohistokimyasal boyama metoduyla) belirlenebilir. Çalışılan dokunun kaspaz-3'ü eksprese ettiği veya apoptozise neden olan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığı bilinmelidir (113, 121).

2.3.4.3. Biyokimyasal Yöntemler

Agaroz Jel Elektroforezi: DNA kırıklarının agaroz jelde yürütülerek oluşturduğu “ladder” görüntüsü saptanabilir. Kısıtlılığı ladder görüntüsünün oluşabilmesi için fazla miktarda DNA’ya gereksinim olmasıdır. Dolayısıyla yöntemin duyarlılığı düşüktür. Ayrıca tek bir hücrede değil, ancak hücre popülasyonlarında apoptozu gösterebilir (122).

Western Blotting: Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sit-C’nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir. Yalnız, sit-C tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrenin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c’nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır (113).

Fluorometrik Yöntem: Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu plaklara hücre lizatlarının eklenmesi ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine fluoresan bir madde ile işaretlenmiş bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan fluoresansın şiddeti ölçülür (123).

2.3.4.4. İmmunolojik Yöntemler

ELISA: ELISA yöntemiyle hem kültürü yapılmış hücre popülasyonunda, hem de plazmada DNA fragmentasyonları tespit edilebilmektedir. M30 düzeyleride bu yöntemle ölçülebilmektedir (113, 121).

Flow Sitometri: Diğer adıyla akış sitometride, apoptozis sonucu ortaya çıkan hücre yüzey proteinlerinin “işaretlenmiş antikor” kullanılarak tespit edilmesi mümkündür. Apoptozisin tesbiti iki şekilde yapılır; Fluoresan bir madde olarak “Propidium iyodür” ya da “Annexin V” kullanılır (115).

2.3.4.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

DNA Microarrays: Bu yöntemle aynı anda ve kısa bir süre içerisinde genlerin ekspresyon derecelerinin saptanması mümkündür. Böylelikle, apoptozise spesifik olan hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri veya kaspazların ekspresyon durumu değerlendirilir (124).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Demirbaş Malzemeler

1. İnkübatör (redLine by BINDER®)
2. Plate Yıkayıcı (das®)
3. ELISA Okuyucu (BIO-TEK® ELx 800)
4. (± 4 °C) Buzdolabı (Uğur®)
5. (-20°C) derin dondurucu (Uğur®)
6. (-80°C) derin dondurucu (New Brunswick Scientific®, C54285 model)
7. Vorteks (Nüve®, NM 110 model, Türkiye)
8. Pipetler (0,5-20 μ l, 0,5-100 μ l, 50-200 μ l, 200-1000 μ l, 1-5 ml) (Brand®)
9. Multipipetler (Multimate®)
10. Pipet ucu (Beyaz, 0.1-10 μ L), (Sarı, 1-200 μ L), (Mavi, 100-1000 μ L) (Beyaz, 1-5 μ L)
11. Distile su cihazı (Nüve®)
12. Cam malzemeler (Mezür, Beher)
13. Jelsiz Boş Biyokimya Tüpü (Hema&Tube®)
14. Eppendorf tüpü
15. Petri Kabı (Isolab®)

3.2 Hasta Seçimi

Çalışmamız, 2011-2012 yılları arasında Tokat Devlet Hastanesi'ne başvuran ve KKKA tanısı alan 44 hasta ile aynı sayıdaki hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyete sahip sağlıklı erişkin gönüllülerden oluşturuldu. KKKA olduğu düşünülen hastaların tanıları, KKKA referans laboratuvarında (Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü) serolojik testler ELISA (IgM) ya da PCR testleri tarafından teyit edilmiştir.

3.3 Trombin Ölçümü

Serum Trombin seviyeleri ELISA kiti (USCN marka) kullanılarak hesaplandı. Serum örnekleri PBS (Phosphate-buffered saline) solüsyonuyla 20 kat dilüe edildi ve standart solüsyonlar kullanıcı el kitapçığına göre hazırlandı.

Yöntemde belirtildiği şekilde, 100'er µL standart, blank ve serum örnekleri Trombin'e özgü antikor ile kaplı kuyucuklara eklendi, üzeri plate kapatıcı ile örtüldü ve 2 saat boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. İnkübatörden çıkarılan plate'in her kuyucuğuna 100µL Detection Reagent A solüsyonundan ilave edildi, plate kapatıcı ile örtüldü ve 1 saat boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 3'er defa yıkandı. Her kuyucuğa 100 µL Detection Reagent B solüsyonundan ilave edildi, plate kapatıcı ile üzeri örtüldü ve 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Daha sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 5'er defa yıkandı. Her kuyucuğa 90 µL Substrate solüsyonu eklendi, üzeri plate kapatıcı ile örtüldü ve ışıktan korunacak şekilde 20 dakika boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Son olarak her kuyucuğa 50µL Stop solüsyonu eklendi ve enzimatik aktivite sonucu oluşan renk değişimi microplate okuma cihazında 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Oluşan rengin şiddeti serum örneğindeki Trombin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Trombin kit prospektüsüne göre ölçülebilir aralık 0.41 ng/mL(nanogram/mililitre) ile 300 ng/mL arasında, sensitivitesi 0,19 ng/ml olarak verilmiştir.

3.3 Kaspaz 3 Ölçümü

Apopitozisin bir belirteci olan serum kaspaz 3 düzeyi ELISA kiti (CUSABİO marka) kullanılarak hesaplandı. Standart solusyonlar kullanıcı el kitapçığında belirtildiği gibi hazırlandı.

Yöntemde belirtildiği şekilde, standart solüsyonlar ve serum örnekleri Kaspaz 3'e özgü antikor ile kaplı kuyucuklara 100'er µL eklendi, üzeri plate kapatıcı ile örtüldü ve 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 3'er defa yıkandı. Her kuyucuğa 100µL HRP-Conjugate solüsyonundan ilave edildi, üzeri plate kapatıcı ile örtüldü ve 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Daha sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 5'er defa yıkandı. Her kuyucuğa 90µL TMB Substrate eklendi, üzeri plate kapatıcı ile örtüldü ve ışıktan korunacak şekilde 20 dakika boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Son olarak her kuyucuğa 50µL Stop solüsyonu eklendi ve enzimatik aktivite sonucu oluşan renk değişimi microplate okuma cihazında 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Oluşan rengin şiddeti serum örneğindeki Kaspaz 3 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Kaspaz 3 kit prospektüsüne göre ölçülebilir aralık 0.312 ng/mL ile 20 ng/mL arasında, sensitivitesi 0,078 ng/ml olarak verilmiştir.

3.4 Kaspaz 7 Ölçümü

Apopitozisin bir diğer belirteci olan serum kaspaz 7 düzeyi ELISA kiti (USCN marka) kullanılarak hesaplandı. Serum örnekleri PBS solüsyonuyla 10 kat dilüe edildi ve standart solusyonlar kullanıcı el kitapçığına göre hazırlandı.

Yöntemde belirtildiği şekilde, 100'er µL blank ve serum örnekleri kaspaz 7'ye özgü antikor ile kaplı kuyucuklara eklendi, üzeri plate kapatıcı ile örtüldü ve 2 saat boyunca 37 °C'de inkübatörde bekletildi. İnkübatörden çıkarılan plate'in her kuyucuğuna 100µL Detection Reagent A solüsyonundan ilave edildi, plate kapatıcı ile örtüldü ve 1 saat boyunca 37 °C'de bekletildi. Sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 3'er defa yıkandı. Her kuyucuğa

100µL Detection Reagent B solüsyonundan ilave edildi, üzeri plate kapatıcı ile örtüldü ve 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübatörde bekletildi. Daha sonra kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 5’er defa yıkandı. Her kuyucuğa 90µL Substrate solüsyonu eklendi, üzeri plate kapatıcı ile örtüldü ve ışıktan korunacak şekilde 20 dakika boyunca 37 °C’de inkübatörde bekletildi. Son olarak her kuyucuğa 50µL Stop Solüsyonu eklendi ve enzimatik aktivite sonucu oluşan renk değişimi microplate okuma cihazında 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Oluşan rengin şiddeti serum örneğindeki Trombin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Trombin kit prospektüsüne göre ölçülebilir aralık 0.156 ng/mL ile 10 ng/mL arasında, sensitivitesi 0,056 ng/ml olarak verilmiştir.

3.5 İstatistiksel Analizler

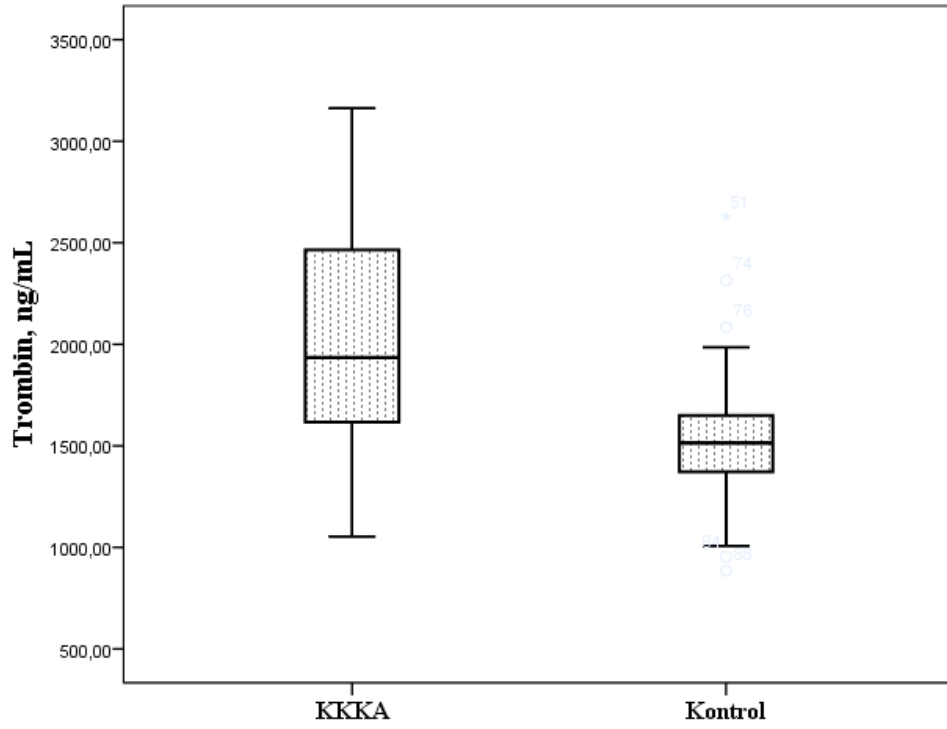
İstatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Versiyon 11.5 (SPSS® Inc. Chicago, IL, United States of America (USA)) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplardaki verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Grupların ortalamaları arasındaki farkın önemi Student’s t testi ile karşılaştırıldı. Parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile araştırıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4.BULGULAR

Çalışmamıza KKKA tanısı alan 44 hasta ile sağlıklı, hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyete sahip erişkin gönüllülerden oluşan 44 kişilik kontrol grubu dahil edildi. Yaptığımız ELISA çalışmalarının istatistiksel analizinde sağlıklı kontrol serumlarına göre KKKA tanısı alan hasta serumlarında trombin düzeyleri ($p<0,001$), Kaspaz 3 düzeyleri ($p<0,001$) ve Kaspaz 7 düzeyleri ($p=0.003$) anlamlı yüksek bulundu (Tablo-6).

Tablo-6: Hasta ve Kontrol gruplarının Trombin, Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 düzeyleri

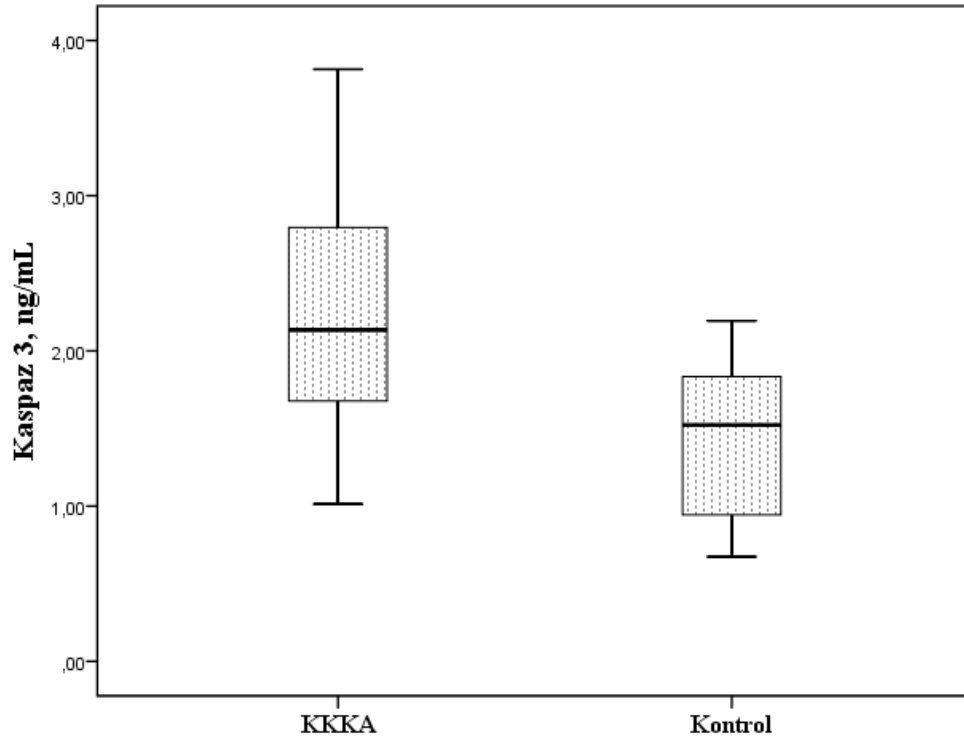
	KKKA	Kontrol	<i>p</i>
Trombin (ng/mL)	2017,5±567,6	1550,6±337,9	<0,001
Kaspaz 3 (ng/mL)	2,2±0,7	1,4±0,4	<0,001
Kaspaz 7 (ng/mL)	3,1±1	2,5±0,8	0,003



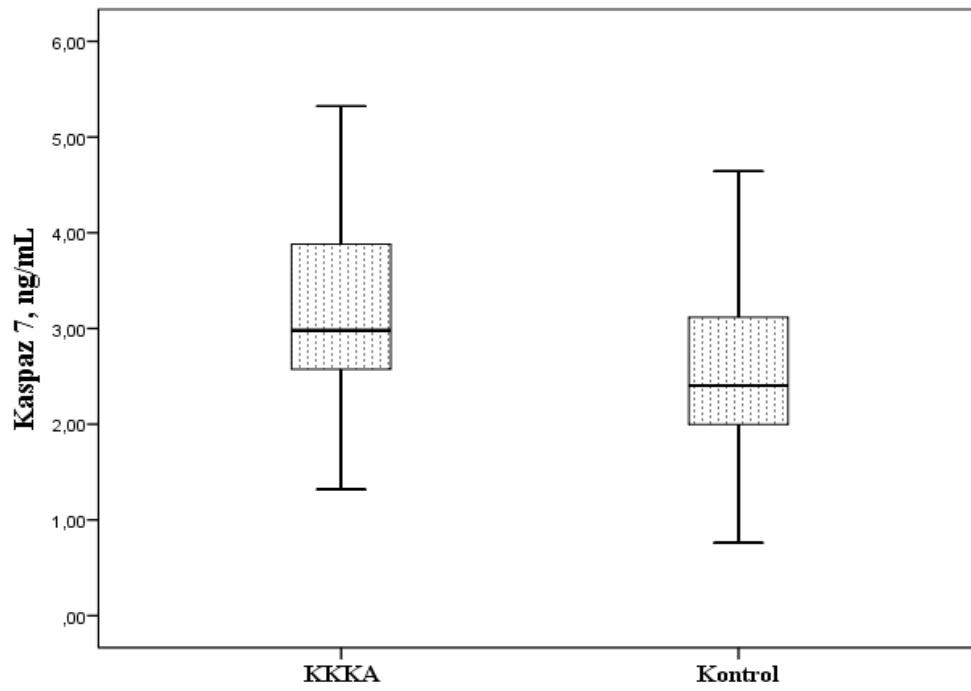
Şekil-11: Hasta ve kontrol gruplarında Trombin düzeyleri

Hasta ve kontrol gruplarındaki trombin düzeylerine bakıldığında KKKA tanısı alan grupta trombin düzeyi sağlıklı kişilere göre belirgin olarak yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Şekil-11).

Apoptotik belirteçler olan Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 nin istatistiksel analizinde, sağlıklı kişilere göre; KKKA tanısı alan grupta Kaspaz 3 düzeyinde daha belirgin olmak üzere her iki apoptotik belirteç de istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek bulundu. (Kaspaz 3 $p < 0.001$, Kaspaz 7 $p = 0.003$) (Şekil-12, Şekil-13).



Şekil-12: Hasta ve kontrol gruplarında Kaspaz 3 düzeyleri



Şekil-13: Hasta ve kontrol gruplarında Kaspaz 7 düzeyleri

Yaptığımız çalışmada Trombin düzeyleri ile Kaspaz 3 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki ($p=0.001$) varken Kaspaz 7 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki yoktur ($p=0.089$). Ayrıca Kaspaz 3 ile Kaspaz 7 arasında da anlamlı bir ilişki yoktur ($p=0.559$) (Tablo-7).

Tablo-7: Trombin, Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 düzeyleri arasındaki korelasyon tablosu

		KASPAZ 3	KASPAZ 7
TROMBİN	<i>r</i>	,356	,182
	<i>p</i>	,001	,089
KASPAZ 3	<i>r</i>		,063
	<i>p</i>		,559

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

KKKA Bunyaviridea ailesi Nairovirus türünden olan virüsün neden olduğu, mortalite oranı %5 ile 30 arasında değişen ölümcül bir hastalıktır (1). Hafif vakalarda üşüme ve titremeye artan ateş, halsizlik, baş ve boğaz ağrısı, bulantı-kusma gibi semptomlar görülürken, ağır vakalarda ciddi kanamalar, bilinç bulanıklığı, şok gibi ağır tablolar ve hatta ölüm görülebilir. Genellikle klinik tablo hafif olmakla birlikte hastaların az bir kısmında kanama bulguları mevcuttur. Bunlar dış eti kanamaları, gastrointestinal ve genitoüriner sistem, akciğer ve beyin kanamalarıdır (2,3). Trombositopeni ve/veya DİK nedeniyle meydana gelen kanama KKKAH'ın önemli bir komplikasyonudur (4). Laboratuvar değerlerinde, lökopeni ve trombositopeni dikkati çekmektedir. PT, aPTT ve diğer pıhtılaşma testlerinde de belirgin bozukluklar görülebilmektedir (6). Yaş, erkek cinsiyet, yüksek ALT AST, WBC, aPTT değerleri, trombosit düzeyleri ve izlem sırasında bu değerlerde azalma kötü prognoz göstergesidir(125). Ayrıca KKKAH olan çocuklarda, artan istirahat kalp hızı (> 96 bpm) şiddetli hastalık için bağımsız risk faktörü olarak bulunmuş (126) ve sıfır (0) kan grubu KKKAH'lı çocukların kanamaya daha yatkın olduğu gösterilmiştir (127).

KKKA ilk kez 1944 te tanımlandığında, ilk majör patolojik bulgusu vasküler disfonksiyon ve hemoraji ile plazma sıvısının intestinal aralığa göçü de bunun sonuçlarıydı. Sovyet uzmanlar ise otopsi bulgularına dayanarak esas olarak kapiller ve küçük damarlara bağlı organlardaki patolojik sürecin kan dolaşımı dağılımı kaynaklı olduğu için hastalığı “infeksiyöz kapiller toksikoz” olarak değerlendirmişlerdir (128). O zamandan bu yana KKKAH hastalarında hastalığın erken evrelerinde anormal koagülasyon parametreleri oluşmakta ve şiddetli hastalıkta DİK tablosu oluşabilmektedir. Ancak vasküler disfonksiyonun direk olarak viral endotelyum hasarına mı bağlı yoksa indirek olarak sirkülatuar proinflamatuvar mediatörlere mi bağlı olarak gerçekleştiği bilinmemektedir (129).

Diğer hemorajik ateş vakalarında olduğu gibi, KKKAH'ın prognoz ve patogeneziinde lenfositler, monosit-makrofaj aktivasyonu, aşırı sitokin salgılanması, interferonların geciktirilmiş induksiyonu, zayıf antikor cevabı, dendritik hücrelerin kısmi aktivasyonu, apoptozis ve hemafagositoz temel rollerinin olduğu söylenmektedir (50, 129-131).

Hastalığın patogenezi ile ilgili yapılan diğerk bazı çalışmalar ise şunlardır:

1997'de 12 vaka üzerinde yapılan bir çalışmada KKKA virüsünün direk olarak insan damarlarını infekte edebildiği viral RNA ve antijenlerinin mononükleer fagositlerde, hepatositlerde ve endotelial hücrelerde saptanmasıyla gösterilmiştir (129, 132).

Kosova'da yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada ölümcül bir şekilde infekte olan KKKA hastalarında interferon gama (IFN- γ), TNF- α ve IL-10 düzeyleri yüksek bulunmuştur (133); Benzer şekilde Arnavutluk'ta hastalıktan dolayı ölen bir hastada da serum TNF- α , Soluble tümör nekrozis faktör reseptörü (sTNF-R), IL-6, ve IL-10 düzeyleri yüksek bulunmuştur. (134). Laboratuvar çalışmalarına bağlı bu klinik gözlemler KKKA virüsünün insan monosit türevi dendritik hücrelerinde çoğalıp proinflatuar sitokinlerin salınımına neden olduğu belirtilmiştir. (135).

Bowick ve ark. KKKA virüsü ile enfekte edilmiş fareler üzerinde yaptıkları çalışmada; farelerin serumunda lökopeni, trombositopeni ve artmış ALT düzeyi gözlemlenmiştir. Hepatik enfeksiyon sonucu geniş karacağier nekrozu ile birlikte dalakta yüksek serum viral replikasyonuna eşlik eden lenfosit düşüklüğü gözlenmiştir. İnsanlardakine benzer şekilde enfekte fare serumlarında yüksek IL-6, IL-10 ve TNF- α düzeyleri saptanmıştır. Farelerde hastalığın son dönemlerinde normal farelere göre artmış interferon (IFN) düzeyleri belirlenmiş bu artışın erken dönemde viral yayılmanın önlenmesi amacıyla olabileceği belirtilmiştir. (136). Ergönül ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada KKKA tanısı almış hastaların serumlarında patogeneizde sitokinlerin önemli rolü olduğunu destekleyen TNF- α , IL-1 ve IL-6' nin artmış seviyeleri bulunmuştur (50).

Bazı bakteriyel ve viral hastalıklarda oksidatif stresin arttığı rapor edilmiştir.(137,138). Duygu F ve ark. yaptığı bir çalışmada viral hepatit-B hastalarında total oksidatif seviye (TOS), lipid peroksidasyonu (LOOH), oksidatif stres indeksi (OSI) ve katalaz (CAT) gibi oksidatif stres belirteçlerinin arttığı total antioksidan seviye (TAS), sülfidril ve seruloplazmin gibi antioksidan durum belirteçlerinin azaldığı gösterilmiştir (139). VKA hastalıklarından olan Dengue virüs enfeksiyonunun patogenezi ile artmış oksidatif stresin ilişkili olabileceği yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (140). Aydın H. ve ark. yaptığı çalışmada ise KKKAH olan çocuk ve erişkin hasta gruplarında TOS, OSI ve LOOH gibi oksidatif stres belirteçlerinin kontrol grubuna göre arttığını bulmuşlardır (141).

KKKA'nın patogenezi tam olarak aydınlatılmış olmamasına rağmen EBOLA virüsü ile benzerlik gösterdiği bilinmektedir. VKA virüslerinin ortak patolojik özellikleri anti-viral cevabı başlatan hücrelere saldırarak, onların işlevlerini bozup konağın bağışıklık yanıtını etkisiz hale getirmeleridir (5). KKKA gibi VKA hastalığı olan EBOLA hemorajik ateşinde, intravasküler alanda ve lenfoid organlarda bulunan lenfositlerde bir çok konakçı-kaynaklı patojenik mekanizma ile yoğun apoptozis olduğu gösterilmiştir (142, 143).

Apoptozis fizyolojik veya patolojik uyarılara sekonder olarak gerçekleşen genetik kontrol altında olan programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozis temel olarak iki yolla başlatılmaktadır; 1-) Hücre dışından tetiklenen, pozitif (TNF α varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) ekstrinsek yol. 2-) Hücre içinde DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen intrinsek yol (144). Apoptozisin başka bir yolu perforin/granzim-A veya B yolunu içermektedir (90). Apoptozisin mekanizması gerçek anlamda tam olarak açıklanamamasına rağmen, ister hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptozis ile bağlantı kurulan en önemli olay kaspazların aktivasyonudur (16,145,146). Kaspazlar inaktif prekürsör olarak hücre sitoplazmasında bulunurlar ve çoğu proapoptotiktir (147, 148).

Virüsler yaşamlarını sürdürmek için enfeksiyona karşı bir savunma mekanizması olan konakçı hücre apoptozisini inhibe etme yeteneği kazanmıştır. Aksine, virüsler viral yayılma veya enfekte olmamış bağışıklık hücreleri öldürmek için apoptozisi uyarması (149). KKKA enfeksiyonunun erken döneminde kaspaz aktivasyonunu baskılar ve enfekte olmamış bağışıklık hücreleri apoptozis ile öldürmek için konakçı hücrede hücre pro-apoptotik molekülleri indükler (150). Barnwal B. ve arkadaşları KKKA'nın yapısal olmayan proteininin (NSs), kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivasyonu ile poli ADP riboz polimeraz (PARP) bölünmesini indüklediğini göstermişlerdir (151).

KKKA virüsü Bunyaviridae ailesindedir ve bu ailedeki diğer bazı önemli virüslerin benzer şekilde apoptozisi uyardığı belirtilmiştir (152). Rift Valley Ateşi virüsü Bunyaviridae ailesinin üyelerindedir ve enfeksiyon sırasında apoptozis indüksiyonunu uyarır (153). Son dönemlerde yine Bunyaviridae ailesi üyelerinden Oropuche virüsünün sitopatik etkiler gösterdiği ve viral protein sentezine bağlı olarak intrinsik apoptotik yolağı uyardığı ve

programlı hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (154). Hantavirüs nükelokapsid proteininin (N) NF-κB (Nuclear Factor kappa B) aracılığıyla apoptozisi düzenlediği gösterilmiştir (155).

Literatürde KKKK hastalarında apoptozis ile ilgili az çalışma yer almaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır:

Rodrigues R. ve ark. yaptığı bir çalışmada karaciğer hücrelerinde KKKAV-kaynaklı apoptozisin mitokondriyal yolu içerdiği gösterilmiştir (156).

Güven AS ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada apoptotik belirteçler olan serum perforin, kaspaz-3 ve sFasL düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre ciddi ve ciddi olmayan KKKK hasta gruplarında önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiş ancak ciddi ve ciddi olmayan KKKK hasta grupları arasında, bu apoptotik belirteçler açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ek olarak yine aynı çalışmada diğer bir apoptozis belirteci olan M30 düzeyleri ile tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (157). Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Karlberg ve ark. yaptığı *in vitro* bir çalışmaya göre KKKAV kaynaklı apoptozis kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, nükleokapsid proteininin kaspaz-3 bağımlı bölünmesi litik KKKAV enfeksiyonuna karşı konakçı savunma mekanizmasını gösterebilir (158). Güven AS ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmanın sonuçlarına göre, apoptotik yollardan perforin içeren sitolitik kesecikler, kaspaz kaskadı ve Fas-FasL aracılı etkileşimlerin KKKK patogeneğinde aktif olduğu bulunmuştur(157).

Çalışmamızda KKKK'lı hasta serumlarında apoptotik belirteç olarak Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 düzeylerine bakıldı ve daha önce belirttiğimiz çalışmalardaki KKKK hastalarında artmış apoptozis düzeyine benzer şekilde (28,29) bizim çalışmamızda da hasta serumlarında ki Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek bulundu (Kaspaz 3 $p<0.001$, Kaspaz 7 $p=0,003$).

Daha önceki çalışmalarda VKA olan hantavirus enkesiyonunun akut döneminde trombin üretiminin arttığı bildirilmesine rağmen KKKAH etyopatogenezisinde trombinin rolü üzerine yapılan herhangi bir araştırmaya rastlamadık (159). Trombin, diğer adıyla aktif faktör 2 (F IIa), kısa yarı-ömürlü bir serin proteazdır, heparin-antitrombin yolu tarafından hızlıca inaktive edilir. Trombinin en belirgin rolü primer hemostazda PAR1 ve PAR4 (Proteinaz aktive eden reseptör) reseptörleri ile trombosit aktivasyonu ve sekonder hemostazda fibrinojen ve faktör 13 aktivasyonu ile stabil trombosit ve fibrin tıkaçları oluşturmaktır (9).

Koagülan etkiye zıt olarak trombin, anti-koagülan etki ve mekanizmaya da sahip bir biyomoleküldür. Trombinin bu antikoagülan etkisi ise Protein C aktivasyonu üzerinden gerçekleşmektedir (10). Trombomodulin, trombinin protein C'yi aktivasyonu sırasında kofaktör olarak rol oynar. Trombin-trombomodulin kompleksi karaciğer tarafından sentez edilen protein C'yi, aktive Protein C (APC) şekline dönüştürür ve daha sonra da APC, önceden aktive olmuş faktör V ve VIII (Va, VIIIA)'i etkisiz hale getirir. Gerek karaciğer ve gereksede endotelde sentez edilen protein S, bu reaksiyonda kofaktör olarak rol oynar (160). APC antikoagülan aktivitesine ek olarak Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1) inaktivasyonu ile fibrinolizi artırır (161). Ayrıca trombin endotel hücrelerinden doku tipi plazminojen aktvatör (t-PA) salınmasını da artırır (162). Sakamoto T ve ark. akut miyokard infarktüsü olan kişilerde APC'nin PAI-1 inhibisyonu ve tromboliz artırıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir (163). Onguru P.ve ark. yaptıkları bir çalışmada Protein C ve protein S düzeylerinin KKKA hastalarının önemli bir bölümünde normalden daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Yine aynı çalışma ile Öztürk B. ve ark. yaptıkları çalışmalarda non-fatal ve fatal KKKA hasta grupları arasında Protein C ve Protein S seviyeleri için anlamlı bir fark bulunmamıştır (21, 164). Bizim çalışmamızda trombin düzeyleri KKKA hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.001$). Fakat protein C ve Protein S düzeylerine bakamadığımızdan dolayı hastalarımızdaki değişimlerini göremedik. Dolayısıyla trombinin böyle bir antikoagülan etkisinin de KKKA hastalarında meydana gelen kanama diatezlerinde rolü olup olmadığı hususunda yorum yapamıyoruz, ama bunu ileri bir çalışmayla daha detaylı bir şekilde aydınlatmayı düşünmekteyiz. Ayrıca yapılacak bu ileri çalışmada aynı hastalarda trombini farklı yönleriyle ele alarak hangi biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerinin KKKA hastalarında görülen hematolojik tablodan daha fazla sorumlu olduğu hususuna ışık tutacaktır.

Zain ve ark. tümör hücrelerinde trombinin konsantrasyon bağımlı bimodal etkileri olduğunu göstermişlerdir; düşük trombin konsantrasyonları, kanser hücrelerinin büyümesini geliştirmiş, yüksek konsantrasyonları ise büyümeyi bozmuş ve apoptozisi indüklemiştir (165). Gugerell A. ve ark. yaptıkları bir çalışmada yüksek trombin konsantrasyonlu fibrin pıhtısı bulunan insan keratinosit hücre kültüründe apoptozisin belirlenmesinde kaspaz 3 ve kaspaz 7 düzeyleri ölçülmüş, düşük ve orta düzeyde trombin konsantrasyonlu gruba göre daha yüksek bulunmuştur. (13). Bizde çalışmamızda KKKK hastalarında yüksek bulunan trombin seviyelerinin yine bu hastalarda yüksek bulduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 7 arasında korelasyon olup olmadığını inceledik. Bulgularımıza göre trombinin kaspaz 3 ($r=0,35$ $p=0,001$) ile pozitif korelasyon gösterdiğini, kaspaz 7 ($r=0,18$ $p=0,89$) ile korelasyon göstermediğini tespit ettik.

S. Sami KARTI “Trombositopeni KKKK vakalarının en tipik laboratuvar bulgusudur, mortalitesi yüksek vakalarda daha ilk günlerde trombosit sayıları $20 \times 10^9 /L$ 'nin altına inebilir, bazılarında ise başlangıçta hafif düşük bir trombosit sayısı varken birinci hafta sonuna doğru sayı çok daha fazla azalır. Hastalığın başlangıcında çok düşük trombosit seviyesinin olması kötü prognoz işaretidir ve hastalığın seyri esnasında ciddi kanamalar gelişebilir. Kanamaların nedeninin multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir. Bu hastalarda kanama nedeni olarak endotel hasarının da rol oynadığı düşünülebilir. Trombositopeni ve lökopeninin nedeni kesin olarak bilinmemektedir” şeklinde ifade etmektedir (166).

Son zamanlarda trombinin çekirdekli hücrelerde apoptozisi modüle edebildiği gösterilmiştir (167). Çekirdeksiz trombositlerde apoptozisin trombosit agonistleri, antitrombotik antikorlar ve yüksek kesme gerilimleri (hem de kan bankacılığı koşullarında saklanan trombositlerde) ile uyarılarak oluştuğu kabul edilmiştir. Trombin klasik trombosit aktivasyonu fonksiyonuna ek olarak Fosfotidilserin maruziyeti, Kaspaz 3 aktivasyonu ve Mitokondriyal iç membran potansiyel ($\Delta\Psi_m$) depolarizasyonunun indüklenmesi ile trombositte apoptozisi başlatır (168-173). Bu nedenle kanın pıhtılaşması sırasında trombositler çok düşük veya çok yüksek trombin düzeylerine maruz kalabilir ve trombin trombosit aktivasyonu ve apoptozisi gibi farklı bir etkiye sahip olabilir(174).

Leytin ve ark. yaptıkları bir çalışmada trombositlerin farklı dozlarda trombinle uyarılmasıyla; düşük dozlarda trombosit aktivasyonu, yüksek dozlarda ise apoptozis olduğunu bulmuşlardır (174). Trombin ve proteaz aktive edici reseptörler arasındaki etkileşim trombosit apoptozisinin eksternal yolunu tetikleyen mekanizma olabilir, buda artmış trombin üretimi ile ilişkili hastalıklarda (sepsis, DİK gibi) trombositopeni patofizyolojisine katkıda bulunabilir (172). Güven AS ve ark. KKKA'li çocuk hastalarda Kaspaz-3'ün PT, INR, aPTT, Ddimer, AST, ALT, LDH ve CRP ile pozitif korelasyon gösterdiğini, ancak trombosit ve trigliserid ile negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır (157). Bu da kaspaz 3 ile trombositopeni arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışma KKKA olan hastalarda trombin, kaspaz 3 ve kaspaz 7 düzeylerinin arttığını gösterdi. Apoptotik belirteçlerden Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 düzeylerinin yüksek olması nedeniyle bu hastalığın patogenezinde ve klinik seyrinde kaspaz kaskadının dolayısıyla apoptozisin kritik bir öneme sahip olabileceği kanaatine vardık. Apoptotik yolların tamamının değerlendirildiği daha kapsamlı çalışmaların yapılması hastalığın patogenezi hakkında aydınlatıcı olacaktır.

KKKA hastalarındaki primer patofizyolojik kanıt eritrosit ve plazmanın vasküler alandan dokulara sızması olarak görülmektedir Ancak bunun altında yatan temel neden halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda artmış kaspaz 3 ve kaspaz 7 düzeylerine bakarak ve yüksek trombin düzeylerinin de apoptozisi arttırabildiği göz önünde bulundurulduğunda indüklenmiş apoptozisin KKKA virüsü nedeniyle oluşan bu hasar üzerinde etkisi olduğu söylenebilir

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularımız ve literatür ışığında KKKA hastalarında kanamanın muhtemel nedenleri olarak; yaygın damar içi pıhtılaşma, trombositopeni ve endotel hasarı sayılabilir (1,4). Fakat tüm hastalarda aynı etyolojik faktörlerin aynı oranda etkili olup olmadığı bilinmemektedir. Kesin olarak şunu ifade edebiliriz ki bu hastaların hepsinde az ya da çok oranda trombositopeni görülmektedir, fakat halen trombositopeninin nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda bu konuya kısmen de olsa ışık tutmaya çalıştık. Bunun için trombositler üzerinde önemli bir uyarıcı etkiye sahip olan trombin

düzeylei ile apopitotik markırları değerlendirmeyi hedefledik. Hastalarımızda trombin düzeylelerini yüksek bulmamıza rağmen trombosit düzeyleleri KKKKA hastalarında beklenildiği şekilde düşüktü. Trombinin trombosit uyarıcı etkisine rağmen trombosit sayısının neden düşük olduğu henüz açıklığa kavuşmamıştır. Çalışmamızda apopitotik markırları değerlendirerek bu konuyu aydınlatmaya çalıştık ve apopitotik belirteçlerden kaspaz 3 ve 7' i her ikisini de yüksek bulduk. Özellikle trombin ile kaspaz 3 düzeyleleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunması, KKKKA hastalarının en tipik laboratuvar bulgusu olan trombositopeninin gelişiminde nedenlerden birinde trombinin tetiklediği trombosit apoptozisinin olabileceği kanaatine vardık. Ayrıca yine bu hastalarda yaygın olarak karşılaşılan kanama diatezlerinde artmış trombin düzeylelerinin ne ölçüde etkili olduğunu ve özellikle de hangi fonksiyonel özelliklerin daha etkin rol oynadığını bilmiyoruz. Ama anlamlı oranda yüksek bulunan trombinin çok fonksiyonel rolünün KKKKA hastalarının etiyopatogenezinde etkili olduğunu düşünmekteyiz. Ancak bu hipotezimizin doğrulanması ve elde ettiğimiz bulgularımızın teyit edilebilmesi için daha detaylı ve ileri *in vitro* ve *in vivo* alışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Burt FJ, Leman PA, Smith JF, et al. The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Virol Methods* 1998; 70: 129-137.
2. Ergönül O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 203-14.
3. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; 1251-1265.
4. Tasdelen Fişgin N, Ergonul O, Doganci L, Tulek N. The role of ribavirin in the therapy of Crimean-Congo hemorrhagic fever: early use is promising. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28(8): 929-933.
5. Gargılı A. Kenelerin vektörlüğü ve Türkiye’de durum. *Ankem Derg*. 2009; 23(Suppl. 2): 249-252.
6. Akyazı R, Ecevit O. Keneler ve Kırım Kongo kanamalı ateşi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2006; 21(3): 340-349.
7. Daldal A, Koruk ST, Çalışır C. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi: Şanlıurfa’da İlk Olgu. *Klimik Dergisi* 2012; 25(1): 44-46.
8. Bakir M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, Bodur H, Tasyaran MA, Vahaboglu H. Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures. *J Med Microbiol* 2005;54(Pt 4): 385-389.
9. Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoguz B, Eren S, Baykam N, 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(2): 284-287.
10. 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): 207-215.
11. Mary E. Bauman, Po-Yin Cheung, M. Patricia Massicotte. Hemostasis and Platelet Dysfunction in Asphyxiated Neonates. *J Ped* 2011; 158: 35-39.
12. Celkan T, Demirel A. Enfeksiyon ve koagülasyon. *Türk Pediatri Arşivi* 2005; 40: 59-67.
13. Gugerell A, Schossleitner K, Wolbank S. et al. High thrombin concentrations in fibrin sealants induce apoptosis in human keratinocytes. *Journal of biomedical materials research* 2012; 100(5): 1239-1247.

14. Leytin V, Allen D.J, Mykhaylov S, Lyubimov E. Freedman J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 4: 2656-2663.
15. Mevorach BD, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement Dependent Clearance Of Apoptotic Cells By Human Macrophages. *J. Exp. Med.* 1998; 188(12): 2313-2320.
16. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
17. Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267: 1456–1462.
18. Vaux D L, Flavell R A. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 719–724.
19. Sonmez M, Aydin K, Durmus A, et al. Plasma activity of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infec* 2007; 55: 184-187.
20. Ozkurt Z, Erol S, Kadanali A, Ozden K. Protein C, Protein S levels and other hematological parameters in patients with Crimean congo hemorrhagic fever. *Proceedings of 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Helsinki, Finland, 16-19 May 2009; 581-582.
21. Onguru P, Dagdas S, Bodur H, et al. Coagulopathy parameters in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever and its relation with mortality. *J Clin Lab Anal* 2010; 24: 163-166.
22. Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci* 1995; 15: 5389–5401.
23. Centers for Disease Control and Prevention. Management of patients with suspected viral hemorrhagic fever. *Morb Mortal Wkly Rep* 1988; 37(Suppl. 3): 1-16.
24. 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
25. 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.
26. Simpson DI. Viral haemorrhagic fevers of man. *Bull WHO* 1978; 56: 819-32.
27. Bodur H. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi ve DAS yönetimi. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi. Antalya 2007: 509-520.

28. Gözalan A, Akin L, Rolain JM, Tapar FS, Oncül O, Yoshikura H, Zeller H, Raoult D, Esen B. Epidemiological evaluation of a possible outbreak in and nearby Tokat province. *Mikrobiyol Bul.* 2004; 38(1-2): 33-44.
29. Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: New outbreaks, new discoveries. *Curr Opin Virol* 2012; 2: 215-220.
30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=11571&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> son erişim: 20/09/2015
31. Özkaya E. Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığının Epidemiyolojisi. 2. Türkiye zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. Ankara. 2008: 67-69.
32. Bakır M. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. *Ankem Dergisi* 2004; 18: 90-93.
33. Whitehouse CA. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Antiviral Res.* 2004; 64(3): 145-160.
34. Flick R. Molecular Biology Of The Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. Ergonul O, Whitehouse C, eds. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective.* Dordrecht: Springer, 2007: 35-44.
35. Hewlett MJ, Pettersson RF, Baltimore D. Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study. *J Virol.* 1977; 21(3): 1085-1093.
36. Elaldı N, Bakır M. Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi. *ANKEM Dergisi* 2006; 20(Ek 2): 227-231.
37. Ergönül Ö. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. *ANKEM Dergisi* 2009; 23(Ek 2): 234-40.
38. Elaldı N. Kırım-Kongo hemorajik ateşi epidemiyolojisi. *Klimik Dergisi*, 2004; 17(3): 151-156.
39. Yen YC, Kong LX, Lee L, Zhang YQ, Li F, Cai BJ, Gao SY. Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 1179-1182.
40. T.C. Sağlık Bakanlığı. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. <http://www.saglik.gov.tr> Erişim tarihi: 10.04.2010;
41. Drosten C, Kümmerer BM, Schmitz H, Günther S. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 61-87.
42. Swanepoel R, Leman PA, Burt FJ, Jardine J, Verwoerd DJ, Capua I, Brückner GK, Burger WP. Experimental infection of ostriches with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Epidemiol Infect.* 1998; 121(2): 427-432.

43. Centers for Disease Control and Prevention. Infection Control for Viral Hemorrhagic Fevers. <http://www.cdc.gov/vhf/cremean-congo/transmission/index.html> Erişim tarihi: 22/09/2015
44. Karti SS, Odabasi Z, Kortzen V. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(8): 1379-1384.
45. World Health Organization. Crimean-Congo haemorrhagic fever. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/en/> Erişim tarihi:22.09.2015
46. <http://www.klimik.org.tr/wpcontent/uploads/2012/02/Keneler%20ve%20CCHF.pdf>, Vatansver Z, Erişim tarihi: 22.09.2015
47. Başol N, Duygu F, Ayan M. Detailed Evaluation of Patients Admitted To Emergency. *Medicina (Kaunas)* 2013;49(8):367-371
48. Geisbert TW, Jahrling PB. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med.* 2004; 10(Suppl. 12): 110-121.
49. Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, Young HA, Reed DS, Geisbert JB, et al. Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am J Pathol* 2003; 163: 2347-2370.
50. 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(7): 941-944.
51. Cagatay A, Kapmaz M, Karadeniz A, Basaran S, Yenerel M, Yavuz S ve ark. Haemophagocytosis in a patient with Crimean Congo haemorrhagic fever, *J Med Microbiol*, 2007; 56(8): 1126-1128.
52. Tasdelen Fisgin N, Fisgin T, Tanyel E, Dogancı L, Tulek N, Guler N ve ark. Crimean-Congo hemorrhagic fever: five patients with hemophagocytic syndrome, *Am J Hematol*, 2008; 83(1): 73-76.
53. Türk Tabipleri Birliği Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu, Birinci Baskı, Mayıs Ankara, Türk Tabipleri Birliği Yayınları: 2010; 20-23
54. 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.
55. David-West TS. Method for accelerated identification of arboviruses after inoculation of mice. *Appl Microbiol.* 1972; 23(3): 437-440.

56. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 1989; 11(Suppl. 4): 801-816.
57. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect.* 1994; 113(3): 551-562.
58. Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci.* 1997; 60(21): 1833-1845.
59. Taşyaran MA ve Özkurt Z. Kırım-Kongo hemorajik ateşi: Tedavi ve korunma. *Klinik Dergisi.* 2004; 17: 157-160.
60. Centers for Disease Control (CDC). Viral hemorrhagic fever: initial management of suspected and confirmed cases. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1983; 32(Suppl. 2): 27-38.
61. 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: 551-554.
62. 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: 1613-618.
63. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2008; 78(1): 125-131.
64. Watts DM, Ussery MA, Nash D, Peters CJ. Inhibition of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral infectivity yields in vitro by ribavirin. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41(5): 581-585.
65. TC. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü (yayımları) Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. Ankara-2004: 1-23.
66. Flick R, Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Curr Mol Med.* 2005; 5(8): 753-60.
67. Ateş Kara. Kırım Kongo hemorajik ateşi, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2006; 49: 175-184.
68. Marcum JA. Defending the priority of 'remarkable researches': the discovery of fibrin ferment. *Hist Philos Life Sci.* 1998; 20(1): 51-76.
69. Bode W. The structure of thrombin, a chameleon-like proteinase. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 2379-2380.

70. Jackson J.M, Colmon R.W, Hirsh J. Mechanisms of protrombin activation in hemostasis and thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Second edition, Philadelphia 1990: 135-147.
71. Robers HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis. Anesthesiology 2004; 100: 722-730.
72. Schenone M, Furie BC, Furie B. The blood coagulation cascade. Curr Opin Hematol 2004; 11: 272-277.
73. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden, Tıbbi Farmakoloji. 8. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti, 1998: 588-620.
74. Rubin BG, Santoro SA, Sicard GA. Platelet interactions with the vessel wall and prosthetic grafts. Ann Vasc Surg. 1993; 7: 200-207.
75. Morgan EG, Mikhail MS, Murray MJ. Klinik Anesteziyoloji. IV. Basım. Ankara: Öncü Basımevi; 2008; 783-788.
76. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji 11. Baskı, Nobel Yayıncılık, 2007, 457-467.
77. Handin RI, Çev: Beyan C, Nevruz O. Kanama Ve Tromboz, Kısım 10, Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL(eds), Harrison İç Hastalıkları Prensipleri, Nobel Kitabevleri, 2004: 354-360.
78. Tintinalli JE, Kelen GD, Stapczynski JS. American college of emergency physicians, Emergency medicine sixth edition, McGraw-Hill, USA, 2004;1322-1323.
79. Bennett JS. Disorders of platelet function: Evaluation and treatment. Cleveland Clin J Med 1991; 58: 413-420.
80. Szántó T, Joutsu-Korhonen L, Deckmyn H, Lassila R. New insights into von Willebrand disease and plate- let function. Semin Thromb Hemost 2012; 38(1): 55-63.
81. Wu KK. Endothelial cells in hemostasis, thrombosis, and inflammation. Hosp Pract 1992; 27: 145-150.
82. Philip Lanzkowsky. Disorders of Coagulation. Manual of Pediatric Hematology and Oncology, Fourth Edition, New York, 2005: 295-322.
83. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. Nature 2001; 413(6851): 74-78.
84. Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-245.
85. Gougeon L. Evaluation Of Apoptosis. Journal Of Immunological Methods. 2002; 265: 1-2.
86. Ameisen J S. The origin of programmed cell death. Science 1996: 1272-1278.

- 87.** Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*. 2001; 2: 91-105.
- 88.** Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2003; 23: 499-508.
- 89.** Wyllie AH, Duvall E. Cell injury and death. *Oxford Textbook of Pathology*. Oxford University Press. 1992: 141-147.
- 90.** Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005; 22: 355-370.
- 91.** Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci* 2001; 26: 61-66.
- 92.** Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E. et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(6): 821-831.
- 93.** Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983-992.
- 94.** Ross MH, Pawlina W. *Histology a text and atlas*. 6th edition. London: Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins; 2011: 93-97.
- 95.** Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 390-397.
- 96.** Ellis RE, Yuan JY, and Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991; 7: 663-698.
- 97.** Smaili S, Hsu Y. et al. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J. Bioener and Biomem.* 2000; 32(1): 35-46.
- 98.** Palmer AM, Greengrass PM, Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*, 2000; 13(6): 378-384.
- 99.** Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of Apoptosis in disease. *AGING*, 2012; 4(5): 332-333.
- 100.** Coşkun G, Özgür H. Molecular Mechanism of Apoptosis and Necrosis, *Archives Medical Review Journal*. 2011; 20(3): 145-58.
- 101.** Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cells response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 594-604.
- 102.** Evan G L, Wyllie A H, Gilbert G S, Littlewood T D, Lond H, Breaks M. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69: 119-128.
- 103.** Wagner A J, Small M B, Itoy N. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2432-2440.

104. Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 1993; 14: 133-144.
105. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırma Dergisi*. 2008; 6: 93-104.
106. Çalışkan M. Apoptosis: Programlanmış hücre ölümü. *Turk J Zool*. 2000; 2: 31-35.
107. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2005; 4: 138-144.
108. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1028-1042.
109. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* 2001; 2(7): 1–10.
110. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA and Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Journal of Cell Biology*. 1999; 144(2): 281-291.
111. Kumar V, Kotran RS, Stanley L. Robbins, çeviri: Prof.Dr.Uğur Çevikbaş. Robbins Temel Patoloji, 7. baskı. 2003: 25-30.
112. Yazıcı P, Alizadehshargh S, Güner-Akdoğan G. Apoptoz: Düzenleyici Moleküller, Hastalıklarla İlişkisi ve Apoptozu Saptama Yöntemleri, *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29(6): 1677-1686.
113. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf
Erişim Tarihi: 25/09/2015
114. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yeppez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007; 139(1): 143-156.
115. Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods--from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem* 2003; 38(3): 275-339.
116. Özgen Ü. Laboratory studies in apoptosis. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2005; 1(3): 106-114.
117. Brumatti G, Sheridan C, Martin SJ. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods* 2008; 44(3): 235-240.
118. Allen RT, Hunter WJ 3rd, Agrawal DK. Morphologic and temporal analysis of vascular smooth muscle cell apoptosis induced by c-myc and E1A *Scanning* 1998; 20(8): 577-586.

119. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* 2008; 44(3): 250-254.
120. Leers M P, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers F C, Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B: Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.* 1999; 187: 567–572.
121. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 1998; 3: 115-116.
122. Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey, Siko- rska M. Detection of DNA Fragmentation and Endonucleases in Apoptosis. *Methods* 1999; 17(4): 329-338.
123. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Van- denabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008; 44(3): 205-221.
124. Sato A, Hiramoto A, Uchikubo Y, Miyazaki E, Satake A, Naito T, et al. Gene expression profiles of necrosis and apoptosis induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Genomics* 2008; 92(1): 9-17.
125. Duygu F, Kaya T, Baysan P. Re-Evaluation of 400 Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Cases in an Endemic Area: Is Ribavirin Treatment Suitable? *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*. 2012;12(9):812-816
126. Oflaz MB, Bolat F, Kaya A, et al. Resting heart rate in children with Crimean-Congo hemorrhagic fever: a tool to identify patients at risk? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14: 59-65. Epub 2013.
127. Güven AS, Sancakdar E, Kaya A, et al. Value of ABO blood group in predicting the severity of children with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7: 416-420.
128. Grashchenkov N.I. Investigation of Etiology, Pathogenesis, and Clinical Symptomatology of Crimean Hemorrhagic Fever, Reports on the 1944 Scientific Investigation of the Institute of Neurology. *Akad. Med. Nauk SSR, Moscow*, 1945; pp. 100–107
129. Burt F.J, Swanepoel R, Shieh W.J, Smith J.F, Leman P.A, Greer P.W, Coffield L.M, Rollin P.E, Ksiazek T.G, Peters C.J, Zaki S.R. 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: 839–846.

130. Akıncı E, Bodur H, Leblebicioglu H. Pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic Fever. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013; 13: 429-437.
131. Bıçakçı Z, Tavil B, Tezer H, Olcay L. Hemophagocytosis in a case with Crimean-Congo hemorrhagic fever and an overview of possible pathogenesis with current evidence. *Turk J Pediatr.* 2013; 55: 344-348.
132. Bente D.A, Alimonti J.B, Shieh W.J, Camus G, Stroher U, Zaki S, Jones S.M. Pathogenesis and immuneresponse of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model. *J. Virol.* 2010; 84: 11089–11100.
133. Saksida A, Duh D, Wraber B, Dedushaj I, Ahmeti S, Avsic-Zupanc T. Interacting roles of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17: 1086–1093.
134. Papa A, Bino S, Velo E, Harxhi A, Kota M, Antoniadis A. Cytokin elevels in Crimean–Congo hemorrhagic fever. *J. Clin. Virol.* 2006; 36: 272–276.
135. Connolly-Andersen A.M, Douagi I, Kraus A.A, Mirazimi A. Crimean Congo hemorrhagic fever virus infects human monocyte-derived dendritic cells. *Virology* 2009; 390: 157–162.
136. Bowick G.C, Airo A.M, Bente D.A. Expression of interferon-induced antiviral genes is delayed in a STAT1 knockout mouse model of Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Virol. J.* 2012; 9: 122.
137. Karsen H, Sunnetcioglu M, Ceylan RM, Bayraktar M, Taskin A, Aksoy N, Erten R. Evaluation of oxidative status in patients with *Faciola hepatica* infection. *African Health Sci.* 2011 Aug; 11 Suppl 1:14-18
138. Moreno-Solís G, de la Torre-Aguilar MJ, Torres-Borrego J, Llorente-Cantarero FJ, Fernández-Gutiérrez F, Gil-Campos M, Túnez-Fiñana I, Pérez-Navero JL. Oxidative Stress And Inflammatory Plasma Biomarkers In Respiratory Syncytial Virus bronchiolitis. *Clin Respir J.* 2015 Dec 9. doi: 10.1111/crj.12425
139. Duygu F, Karsen H, Aksoy N, Taskin A. Relationship of Oxidative Stress in Hepatitis B Infection Activity with HBV DNA and Fibrosis. *Ann Lab Med.* 2012 Mar; 32(2):113-118.
140. Lizette Gil, Gregorio Martínez, Rolando Tápanes, Osvaldo Castro, Daniel González, Lidice Bernardo, Susana Vázquez, Gustavo Kourí, And María G. Guzmán. Oxidative Stress In Adult Dengue Patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(5), 2004, 652–657

141. Aydin H, F. Mutlu Kukul Guven, Abdulkemir Yilmaz, Aynur Engin, Ismail Sari, Deniz Bakir. Oxidative stress in the adult and pediatric patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever. *J Vector Borne Dis* 50, December 2013; 297–301
142. Bray M, Geisbert TW. Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:1560-1566.
143. Geisbert TW, Hensley LE, Gibb TR, Steele KE, Jaax NK, Jahrling PB. Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses. *Lab Invest* 2000; 80: 171–186.
144. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*. Mar; 14(3):126–130.
145. Choen GM. Caspases, the executioners of apoptozis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16.
146. Lee D, Scott AL, Jerry AL. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptozis and maintain cell functionally. *J Biol Chem* 2000; 275: 16007-16014.
147. Ozawa H, Keone RW, Marcilla AE. Thetapeutic stragies targetting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2002;177:306-313.
148. Wang KK. Calpain and caspase can you tell the differance? *Trends Neuroscience* 2000; 23: 20-26.
149. Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, and Kroemer G. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog.* 2008; 4: 1000018
150. Karlberg H, Tan Y. J, and Mirazimi A. Crimean-Congo haemorrhagic fever replication interplays with regulation mechanisms of apoptosis. *J. Gen. Virol.* 2015; 96: 538-546.
151. Barnwal B, Karlberg H, Mirazimi A, Tan YJ. Non-structural protein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus disrupts mitochondrial membrane potential and induces apoptosis *J. Biol. Chem.* published online November 16, 2015 doi:10.1074/jbc.M115.667436
152. Pekosz A, Phillips J, Pleasure D, Merry D, and Gonzalez-Scarano F. Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. *J.Virol.* 1996; 70(8): 5329–5335.
153. Won S, Ikegami T, Peters C.J, and Makino S. NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis. *J.Virol.* 2007; 81(24): 13335–13345.

- 154.** Acrani G.O, Gomes R, Proença-Modena J.L, daSilva A.F, Carminati P.O, Silva M.L, Santos R.I, and Arruda E. Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *VirusRes.* 2010; 149(1): 56–63.
- 155.** Ontiveros S.J, Li Q, and Jonsson C.B. Modulation of apoptosis and immune signaling pathways by the Hantaan virus nucleocapsid protein. *Virology* 2010; 401(2): 165–178.
- 156.** Rodrigues R, Paranhos-Baccalà G, Vernet G, Peyrefitte CN. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-infected hepatocytes induce ER-stress and apoptosis crosstalk. *PLoS One.* 2012; 7: e29712. DOI: 10.1371/journal.pone.0029712
- 157.** Güven AS, Sancakdar E, Uysal EB, Kaya A, Oflaz MB, Karapınar H, Bolat F, Tuzcu N, Deveci K, Cevit Ö, İcagasioglu FD. Evaluation of serum perforin, caspase-3, sFasL and M-30 levels as apoptotic markers in children with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J.* 2015 Feb;34(2):208-13
- 158.** Karlberg H, Tan YJ, Mirazimi A. Induction of caspase activation and cleavage of the viral nucleocapsid protein in different cell types during Crimean-Congo hemorrhagic fever virüs infection. *J Biol Chem.* 2011; 286: 3227-3234.
- 159.** Laine O, Mäkelä S, Mustonen J, Huhtala H, Szanto T, Vaheri A, Lassila R, Joutsikorhonen L. Enhanced thrombin formation and fibrinolysis during acute Puumala hantavirus infection. *Thromb Res.* 2010 Aug; 126(2): 154-8. doi: 10.1016/j.thromres.2010.05.025. Epub 2010 Jul 1.
- 160.** Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 2005; 24: 1374-1383.
- 161.** Sakata Y, Curriden S, Lawrence D, Griffin JH, Loskutoff DJ: Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 1121–1125.
- 162.** Yurdakök M. Yenidoğanda Antikoagulan Proteinler ve Fibrinolitik Sistem. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 2000; 43: 185-205
- 163.** Sakamoto T, Ogawa H, Takazoe K, Yoshimura M, Shimomura H, Moriyama Y, Arai H, Okajima K: Effect of activated protein C on plasma plasminogen activator inhibitor activity in patients with acute myocardial infarction treated with alteplase: comparison with unfractionated heparin. *J Am Coll Cardiol* 2003, 42:1389–1394.

- 164.** Ozturk B, Tutuncu E, Kuscu F, Gurbuz Y, Sencan I, Tuzun H. Evaluation of factors predictive of the prognosis in Crimean-Congo hemorrhagic fever: new suggestions. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011; 16: 89-93
- 165.** Zain J, Huang Y.Q, Feng X, Nierodzik M.L, Li J.J. & Karpatkin S. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. *Blood*. 2000; 95: 3133–3138.
- 166.** S. Sami KARTI. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. 35. Ulusal Hematoloji Kongresi. 2009;109-114.
- 167.** Flynn A.N, Buret A.G. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. *Apoptosis*, 2004; 9: 729–737.
- 168.** Wolf B.B, Goldstein J.C, Stennicke H.R, Beere H, Amarante-Mendes G.P, Salvesen G.S, Green D.R. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*. 1999; 94: 1683–1692.
- 169.** Brown S.B, Clarke M.C, Magowan L, Sanderson H, Savill J. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 5987–5996.
- 170.** Leytin V, Freedman J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfusion Apheresis Science*. 2003; 28: 285–295.
- 171.** Leytin V, Allen D.J, Mykhaylov S, Mis L, Lyubimov E.V, Garvey B. Freedman J. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2004; 320: 303–310.
- 172.** Leytin V, Allen D.J, Mykhaylov S, Lyubimov E. Freedman J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 4: 2656-2663.
- 173.** Leytin V, Mykhaylov S, Starkey A.F, Allen D.J, Lau H, Ni H, Semple J.W, Lazarus A.H, Freedman J. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-GPIIb-induced platelet apoptosis in a murine model of ITP. *British Journal of Haematology*. 2006b; 133: 78–82.

174.Leytin V, Allen D.J, Lyubimov E, and Freedman J. Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation. *British Journal of Haematology*. 2007; 136: 762–764.