

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

**KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKKA) OLAN
HASTALARDA SERUM ISI ŞOK PROTEİN (HSP-27, HSP-47,
HSP-70, HSP-90) DÜZEYLERİNİN OKSİDATİF DURUM VE
ÇEŞİTLİ İNFLAMATUAR BELİRTEÇLERLE
KORELASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali Said KADAK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA

2016

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

**KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA) OLAN
HASTALARDA SERUM ISI ŞOK PROTEİN (HSP-27, HSP-47,
HSP-70, HSP-90) DÜZEYLERİNİN OKSİDATİF DURUM VE
ÇEŞİTLİ İNFLAMATUAR BELİRTEÇLERLE
KORELASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali Said KADAK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten AKSOY

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 24.06.2015 tarih ve 15096 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2016

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her türlü desteği benden esirgemeyen, bilgi ve becerilerimin gelişmesinde büyük katkıları olan değerli tez hocam Prof. Dr. Nurten AKSOY'a,

Bilgi ve birikimlerinden her zaman faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYIĞIT, Prof. Dr. Seyithan TAYSI, Prof. Dr. Özcan EREL ve Doç. Dr. Şahbettin SELEK'e,

Tez çalışmam sırasındaki desteklerinden dolayı Doç. Dr. Fazilet DUYGU' ya, Eğitimim süresince değerli katkılarından dolayı değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hatice Sezen, Yrd. Doç. Dr. Emin ŞAVİK ve Yrd. Doç. Dr. Hasan BİLİNÇ'e,

Asistanlık sürem boyunca birlikte çalıştığım Abdullah TAŞKIN, Ahmet KAYMAZ, Begüm Hilal CEYLAN, Bülent ADAR, Murat ÜSTÜNEL, Selçuk AKIN ve değerli biyokimya laboratuvarı çalışanlarına, başta Tevrat ZERAY ve M. Murad ALKAN olmak üzere dekanlık çalışanlarına, özellikle de anneme ve babama teşekkür ederim.

Dr. Ali Said KADAK

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET	IX
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Etken	3
2.1.3. Epidemiyoloji	4
2.1.4. Virüs Mikrobiyolojisi	6
2.1.5. Risk Grupları	7
2.1.6. Bulaşma Yolları	8
2.1.7. Patogenez	9
2.1.8. Klinik Özellikler	11
2.1.8.1. İnkübasyon Dönemi	12
2.1.8.2. Prehemorajik Dönem	12
2.1.8.3. Hemorajik Dönem	13
2.1.8.4. İyileşme Dönemi (Konvelesan Periyod)	13
2.1.9. Tanı	13
2.1.9.1. Tanıya Yardımcı Laboratuvar Testleri	14
2.1.9.2. Virüs İzolasyonu	14
2.1.9.3. İmmünolojik Yöntemler	14
2.1.9.4. Moleküler Tanı Yöntemleri	15
2.1.10. Ayırıcı Tanı	15
2.1.11. Tedavi	16
2.1.12. Prognoz	17
2.1.13. Korunma ve Kontrol	17
2.2. Oksidan/Antioksidan Sistem	18

2.2.1. Serbest Radikaller: Tanım ve Oluşum Mekani	18
2.2.2. Reaktif Oksijen türleri	20
2.2.2.1. Süperoksit Radikali	20
2.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	21
2.2.2.3. Hidroksil Radikali (HO ⁻)	21
2.2.2.4. Singlet Oksijen (↑↓)	22
2.2.2.5. Nitrik Oksit (NO [·])	22
2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri	23
2.2.3.1. Proteinlere Etkileri	23
2.2.3.2. Nükleik Asitlere Etkileri	24
2.2.3.3. Karbonhidratlara Etkileri	24
2.2.3.4. Lipitlere Etkileri	24
2.2.4. Antioksidan Mekanizmalar	26
2.2.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	28
2.2.4.2. Katalaz	28
2.2.4.3. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd)	29
2.2.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	29
2.2.4.5. Glutasyon-S-Transferaz (GST)	30
2.2.4.6. Glutasyon (GSH)	30
2.2.4.7. Tiyoredoksin Sistem	31
2.2.4.8. C Vitamini	31
2.2.4.9. Karotenler (A vitamini)	32
2.2.4.10. Tokoferoller (E Vitamini)	32
2.2.4.11. Melatonin	32
2.3. Isı Şok Proteinleri	32
2.3.1. Tanım	32
2.3.2. Isı Şok Protein Ailesi ve Fonksiyonları	33
2.3.3. Şaperon Fonksiyonu	35
2.3.4. Protein İndirgenmesi	36
2.3.5. Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrolü	36
2.3.6. Anti-apoptotik Etki	37
2.3.7. Isı Şok Proteinleri ve İmmünite	37
2.3.8. Hücresel Stres Cevabı	38
2.4. Fibronektin	39

2.5. Platelet-Aktive Edici Faktör (PAF)	39
2.6. Seruloplazmin	40
3.GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması	41
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	41
3.3. Serum HSP, PAF ve Fibronektin Düzeylerinin Belirlenmesi	41
3.4. Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü	43
3.5. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü	43
3.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Hesaplanması	44
3.7. Seruloplazmin (Ferooksidaz) Düzeyi Ölçümü	44
3.8. Yapılan İstatistiksel Analizler	44
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
KAYNAKLAR	66

Œekil-1: 2004-2014 Yılları Arasında Görülen KKKA Vaka ve Ölüm Sayıları	5
Œekil-2: 2014 Yılı İllere Göre Kırım Kongo Kanamalı AteŒi İnsidansı	5
Œekil-3: KKKAV Genomunun Œematik Görünümü	7
Œekil-4: Kırım-Kongo Kanamalı AteŒi Virüsünün BulaŒ Döngüsü	9
Œekil-5: KKKA Patogenezinin Œematik Gösterimi	11
Œekil-6: KKKA' nın Klinik ve Laboratuvar Seyri	12
Œekil-7: Radikallerin Yol Açtığı Hücre Hasarı	26
Œekil-8: Antioksidan Gruplar ve Görevleri	27
Œekil-9: Platelet-Aktive Edici Faktör Yapısı	40
Œekil-10: HSP70 Standart Eğrisi	43
Œekil-11: HSP70 ile OSİ arasındaki pearson korelasyon analizi	48
Œekil-12: HSP90 ile OSİ arasındaki pearson korelasyon analizi	48
Œekil-13: HSP27 ile OSİ arasındaki pearson korelasyon analizi	49
Œekil-14: HSP47 ile OSİ arasındaki pearson korelasyon analizi	49
Œekil-15: HSP70 ile Seruloplazmin arasındaki pearson korelasyon analizi	50
Œekil-16: HSP90 ile Fibronektin arasındaki pearson korelasyon analizi	50
Œekil-17: HSP90 ile PAF arasındaki pearson korelasyon analizi	51
Œekil-18: Fibronektin ile PAF arasındaki pearson korelasyon analizi	51

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo-1: Ülkemizde İzlenen KKKA Hastalarının Başlıca Semptomları	11
Tablo-2: Radikal ve Radikal Olmayan Oksijen Türevi Bileşikler	23
Tablo-3: KKKA ve Kontrol Gruplarındaki Parametrelerin Karşılaştırılması	45
Tablo-4: Isı Şok Proteinleri ile Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki Korelasyon Tablosu	46
Tablo-5: Isı Şok Proteinleri ile İnflamatuar Belirteç Parametreleri Arasındaki Korelasyon Tablosu	47



KISALTMALAR

KKKA	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
VKA	: Viral Kanamalı Ateş
KKKAV	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
STAT	: signal transducer and activator of transcription
HSP	: Heat Shock Protein
SOD	: Süperoksit Dismutaz
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TOS	: Total Oksidan Seviye
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
vWF	: von Willebrand Faktör
PAFR	: Trombosit-Aktive Edici Faktör Reseptörü
DİK	: Dissemine İntravasküler Koagülasyon
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa Beta
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
LPS	: Lipopolisakkarit
TBARS	:Tiyobarbitürik Asit Türevleri
LOOH	:Lipid Hidroperoksit
IL-1	:İnterlökin-1
TLR	:Toll-like reseptör
NO	:Nitrik Oksit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
CAT	: Katalaz

ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endothelial Cell
CCHF	: Crimean Congo Hemorrhagic Fever
GSH	: Redükte Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
RT-PZR	: Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
CRP	: C-Reactive Protein
LOO	: Lipit peroksil radikali
TTL	: Total Thiol Level
TrxR	: Tiyoredoksin Redüktaz
Cp	: Serüloplazmin
GR	: Glutasyon Redüktaz
SIRS	: Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu
HSAEC	: Human small airway endothelial cell
ÇOYS	: Çoklu organ yetmezlik sendromu
TRAP	: Total radical-trapping antioxidant parameter
NADPH oksidaz	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat-Oksidaz
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
MAPK	: Mitojenle-aktive protein kinaz
Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor 1
ER	: Endoplazmik Retikulum
AP1	: Activator Protein 1
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
ZO-1	: Zonula occludens-1
TEER	: Trans endothelial resistance
NETs	: Neutrophil Extracellular Traps
IFA	: İmmünofluoresans Antikor
PON	: Paraoxonase

ÖZET

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olan Hastalarda Serum Isı Şok Protein (Hsp-27, Hsp-47, Hsp-70, Hsp-90) Düzeylerinin Oksidatif Durum ve Çeşitli İnflamatuvar Belirteçlerle Korelasyonunun Değerlendirilmesi

Dr. Ali Said KADAK

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Giriş ve Amaç: Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) Bunyaviridae ailesi, Nairovirüs cinsine mensup KKKA virüsü (KKKAV) tarafından oluşturulan kene kaynaklı bir viral kanamalı ateş ve zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır. Oksidatif stres oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Isı şok proteinleri immün sistemde tehlike sinyalleri olarak immün aktivasyon ortaya koyar ya da eksojen stres uyarılarının yol açtığı ölümcül hasara karşı hücreleri korur. Bu çalışmanın amacı, KKKA hastalarında ısı şok protein düzeyleri ile oksidatif durum, PAF, fibronektin arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, hasta grubu 2011-2012 yılları arasında Tokat Devlet Hastanesine başvuran hastalar arasında PZR/ELISA sonucu pozitif, 44 KKKA vakasından oluşturuldu. Sigara içmeyen, viral ya da metabolik herhangi bir hastalığı olmayan yaş ve cinsiyet olarak hasta grubuyla uyumlu 44 gönüllü, kontrol grubu olarak kaydedildi. Serum numuneleri çalışma yapılıncaya kadar -80°C ' de saklandı. Serum HSP27, HSP47, HSP70 ve HSP90 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. TAS ve TOS düzeyleri kolorimetrik yöntem kullanılarak ölçüldü ve OSI hesaplandı. Fibronektin ve PAF ELISA yöntemiyle ölçüldü. İstatistiksel analiz SPSS 15.0 kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama + standart sapma olarak kaydedildi.

Bulgular: TOS ve OSI düzeyleri KKKA hastalarında, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0.001$). KKKA hastaları ve sağlıklı kontroller arasındaki ortalama TAS değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Serum HSP27, HSP70 ve HSP90 düzeyleri KKKA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. ($p<0.001$). Hasta grubundaki ortalama HSP47 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksekti fakat aradaki

farlılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). HSP70 ve OSİ arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon vardı ($r: 0.718, p<0.001$). PAF ve fibronektin düzeyleri arasında anlamlı derecede negatif korelasyon bulundu ($r:-0.782, p<0.001$).

Tartışma ve Sonuç: KKKAV'nün neden olduğu enfeksiyonun KKKA hastalarında oksidatif stresi ve ısı şok protein düzeylerini arttırmış olduğunu söyleyebiliriz. Artan ısı şok proteinleri hastalığın patogeneğinde temel mekanizma olan sitokin fırtınasının neden olduğu sitokin aracılı endotel hasarına katkıda bulunmuş olabilir. Oksidatif stres ve ısı şok proteinleri arasındaki ilişkinin kesin mekanizmalarını ve bu ilişkinin KKKA enfeksiyonunun klinik seyrine etkisini açıklamak için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Isı şok protein, Oksidatif Stres, KKKA, Fibronektin, PAF



SUMMARY

Evaluation of Serum Heat Shock Protein (Hsp-27, Hsp-47, Hsp-70, Hsp-90) Levels Correlation with Oxidative Status and Various Inflammatory Parameters in Crimean- Congo Haemorrhagic Fever Patients

Ali Said KADAK, MD

Specialty thesis, Department of Medical Biochemistry

Introduction and Objective: Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), a tick-borne viral hemorrhagic fever, is a zoonotic infection that caused by CCHF virus (CCHFV) of the family Bunyaviridae, genus Nairovirus. Oxidative stress is defined as an unbalance between oxidants and antioxidants. HSPs exert immune activation as danger signals in immunity or protect cells from lethal damage induced by exogenous stress stimuli. The aim of this study is to investigate relationship between heat shock protein levels and oxidative stress, PAF, fibronectin in CCHF patients.

Material and Method: In this study, the patient group consisted of 44 cases with a positive diagnosis of CCHF according to PCR/ELISA outcome among the patients referred to Tokat Government Hospital between the years 2011-2012. A total of 44 volunteers who were not having any viral or metabolic diseases, non-smokers, age and gender matched with the patients group were enrolled as the control group. The serum samples were stored at -80°C until the study was carried out. Serum HSP27, HSP47, HSP70 and HSP90 levels were measured by ELISA. TAS, TOS were measured using colorimetric method and OSI was calculated. Fibronectin and PAF were measured by ELISA. Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 (II, USA). Results were enrolled mean + standard deviation.

Findings: TOS and OSI values are significantly higher in CCHF patients as compared to the controls ($p < 0.001$). The difference in mean TAS values between CCHF patients and healthy controls was not statistically significant ($p > 0.05$). Serum HSP27, HSP70 and HSP90 levels were significantly higher in patient group as compared to the control group ($p < 0.001$). There was a significant positive correlation between OSI and HSP70 ($r: 0.718, p < 0.001$). A significant negative correlation was found between PAF and fibronectin levels ($r: -0.782, p < 0.001$).

Discussion and Conclusion: We can say that viral infection caused by CCHFV may increased oxidative stress and heat shock protein levels in CCHF patients. Increased heat shock protein levels may provide a contribution to the ‘cytokine storm’ which is basic mechanism of pathogenesis lead to cytokine-mediated endothelial injury. More extensive studies are required to clarify the precise mechanisms of the interaction between oxidative stress and heat shock proteins, and the influence of this relationship on the clinical course of CCHF infection.

Key Words: Heat shock protein, Oxidative stress, CCHF, Fibronectin, PAF



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) 2002 yılından itibaren ülkemizde görülmeye başlayan, ateş ve kanamalarla seyreden, zoonotik bir hastalıktır. İnsandan insana bulaşabilir. Etken Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV)'dür. Virüs Bunyaviridae ailesinin Nairovirüs cinsine mensuptur. Virüs insanlara genellikle enfekte kenelerin tutunması, teması yada enfekte hayvanların kan, vücut sıvısı ve dokularıyla temas yoluyla bulaşır. Enfekte kişilerden nazokomiyal bulaş olabilmektedir. Ülkemizde olgular özellikle ülkenin kuzeydoğusunda sıklıkla ilkbahar ve yaz aylarında görülmektedir (1). Son yıllarda toplum veya hastane kaynaklı KKKA vaka sayılarında artış gözlenmiştir. KKKAV'nün biyoterörizm ajanı olarak olası kullanımı, insandan insana bulaşma özelliği, aşısının ve etkili bir antiviral tedavisinin olmaması gibi etmenler halk sağlığı açısından bu virüsü önemli bir patojen yapmaktadır. KKKAV'nü içeren örneklerin taşınması için yüksek düzeyde güvenlik önlemlerinin alınması gerekir. Ayrıca virüs izolasyonu biyogüvenlik seviyesi 4 (BSL-4) şartlarını sağlayan laboratuvarlarda yapılmalıdır. Tüm bu zorluklar virüsün yeterli düzeyde araştırılmasını kısıtlamaktadır (2).

Normal metabolizma sırasında hücrede sürekli reaktif oksijen türleri oluşur. Antioksidan savunma sistemi tarafından oluşan serbest radikaller etkisiz hale getirilir. Böylece oksidan/antioksidan seviyeleri belirli bir dengede tutulur. Oksidatif stresi değerlendirmek için, oksidan veya antioksidan özellik gösteren pek çok parametre ölçülebilir. Bu maddeler birbirlerinin etkisini antagonize ya da potansiyelize ederler. Toplam Oksidan Seviye (TOS), Toplam Antioksidan Seviye (TAS) ölçülerek hesaplanan Oksidatif Stres İndeksi (OSI), oksidatif durumun bütünü yansıması açısından önemlidir (3,4).

Isı şok proteinleri yüksek derecede korunmuş, şaperon fonksiyonuna sahip hücre içi proteinler olup, çeşitli stres uyaranlarına cevap olarak hücrede sentezi artar. Molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılan bu proteinlerin, son yıllarda hücre içi görevlerinin yanı sıra hücre dışında da fonksiyon gösterdikleri anlaşılmış, anti-apoptotik, anti-inflamatuar özellikleri olduğu gösterilmiştir (5). Şaperon fonksiyonlarının haricinde sitokin olarak fonksiyon gösterdikleri de belirtilmiştir (6).

Fibronektin, PAF ve seruloplazmin ferooksidaz aktivitesi çeşitli inflamatuvar belirteçler olarak değerlendirilebilir. Fibronektin başlıca karaciğer ve endotelden sentezlenen

bir glikoproteindir. Literatürde özellikle preeklampside damar endotel hasarını gösterdiği belirtilmiştir. PAF alerji, inflamasyon, pıhtılaşma ve vasküler geçirgenlik artışında önemli rol oynayan bir lipid mediyatördür. Seruloplazmin ferrokksidaz aktivitesine sahip bir akut faz reaktandır. Sistemik inflamasyonu yansıması bakımından önemlidir (3). Fibronektin endotelial aktivasyon ve inflamasyon belirteci olarak, PAF vasküler geçirgenlik ve sistemik inflamasyon belirteci olarak, ferrokksidaz aktivitesi ise sistemik inflamasyon belirteci olarak değerlendirilmiştir.

Bilgilerimize göre literatürde Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi'nde ısı şok proteinleriyle ilgili bu zamana kadar yapılmış herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışmada KKKA hastalarında serum HSP27, HSP47, HSP70 ve HSP90 düzeyleriyle TAS, TOS, OSI, fibronektin, PAF, serüloplazmin arasındaki ilişkiyi değerlendirip literatüre katkıda bulunmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Afrika, Asya, Güneydoğu Avrupa ve Orta Doğu olmak üzere otuz civarında ülkede tanımlanmış ölümcül seyredabilen bir viral kanamalı ateş (VKA) enfeksiyonudur (8). Virüs, Bunyaviridae familyasının Nairovirus cinsindedir (9). KKKAV, kene ile taşınan virüsler arasında en geniş coğrafik dağılım gösteren virüstür. Hastalığın dağılımı Hyalomma türü kenelerin coğrafik dağılımına uymaktadır (7).

2.1.1 Tanım

Kanamalı ateş hastalıkları; ağır klinik seyirli, mortalitesi yüksek olan, ateşle seyreden, şiddetli olgularda kanama ve şok ile karakterize akut enfeksiyon hastalıklarıdır. Viral kanamalı ateşler ise virüslerin neden olduğu kanamalı ateş hastalıklarını ifade eder. Coğrafik olarak sınırlı birçok virüs ile ilişkili hastalıkları yansıtmaktadır. Günümüzde VKA oluşturan en az 14 farklı virüs, dört farklı familya içinde sınıflandırılmıştır: VKA oluşturan virüsler; Filoviridae (Marburg virus ve Ebola virus), Arenaviridae (Lassa virus ve Junin, Machupo, Sabia ve Guanarito virus), Bunyaviridae (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), Rift Valley fever virus ve Hantavirus) ve Flaviviridae (Yellow fever virus ve Dengue virus) gibi RNA virüsleridir (10,11).

2.1.2 Etken

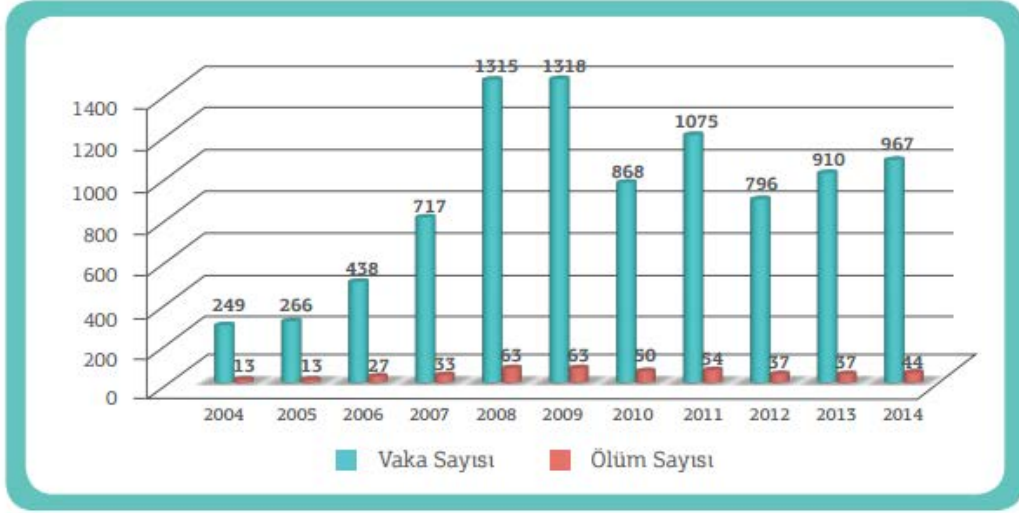
KKKA etkeni olan KKKAV, Bunyaviridae familyasından Nairovirus türünde yer alan bir RNA virüsüdür. Virüs, insanlarda diğer VKA'lar gibi yaygın mukokütanoz, gastrointestinal ve genitoüriner kanamalar, ateş ve karaciğer fonksiyon testlerinde bozulmayla giden akut bir enfeksiyon hastalığı oluşturur (12). Bu virüsler, tek sarmallı RNA genomuna sahip, lipid zarflı ve çeşitli morfolojik görünümlere sahip virüslerdir. VKA virüslerinin çoğunluğu zoonotiktir. Büyük bir çoğunluğu vektörler ile bulaşır (Rift Vadisi Ateşi virüsü, KKKAV, Sarı Humma virüsü, Dengue virüsü, Omsk Kanamalı Ateşi virüsü, Kyasanur Orman Hastalığı virüsü ve Alkhumra virüsü), bir kısmında ise bulaşmada vektörlerin rolü yoktur (Lassa virüsü, Junin virüsü, Machupo virüsü, Guanarito virüsü, Sabia virüsü, Hanta virüsler,

Marburg virüs ve Ebola virüs). Bu virüslerden Lassa, Ebola, Marburg ve KKKAV insandan insana bulaşabilen virüslerdir (2). Bunyaviridae familyası, serolojik açıdan birbirinden farklı beş tür bulundurur. Bunlar Orthobunya virüs, Hanta virüs, Nairo virüs, Phlebo virüs ve Tospo virüstür. Nairo virüs türü virüsler, yedi alt gruba ayrılır (KKKAV, Dera Ghazi Khan virüs, Hughes virüs, Nairobi Sheep Disease (NSD) virüs, Qalyub virüs, Sakhalin virüs ve Thiafora virüs grupları). Bu gruplar içerisinde kenelerle bulaşabilen 34 ayrı virüs bulunur. Bu 34 virüsten insanlarda hastalık oluşturabilen virüsler KKKAV, NSD virüs ve Dugbe virüslerdir (13,14). Virüs, dezenfektanlara ve çevresel koşullara göreceli dayanıksızdır. Konak dışında yaşayamaz, kuru havada 56°C'de 30 dakikada inaktive olur.%1'lik sodyum hipoklorit çözeltisiyle, %2'lik glutaraldehit ve mor-ötesi ışınlarıyla aktivitesini hızla kaybeder. Kanda 40 °C'de 10 gün yaşayabilir. Hücre kültürlerinde üretilebilir (13).

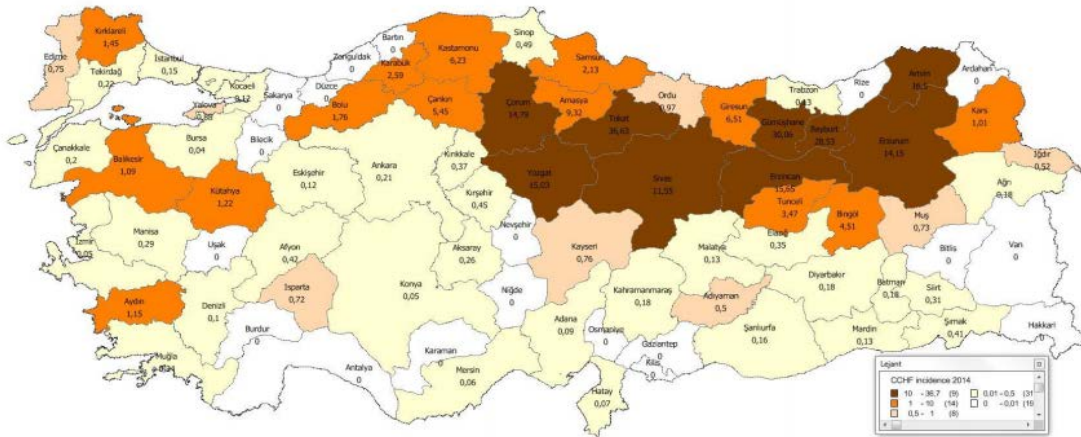
2.1.3 Epidemiyoloji

KKKA tablosuna benzer bir hastalığın ilk defa 1100'lü yıllarda Orta Asya'da yaşayan bir hekim tarafından tanımlandığı bildirilmiştir. Hastalıkla ilgili ilk tıbbi bilgiler II. Dünya Savaşı yıllarına dayanmaktadır. Hastalık ilk olarak 1945 yılları yaz aylarında Nazi işgali altındaki Kırım yarımadasına bir sefer sırasında, savaştan tahrip olmuş bölgelerde köylülere yardım eden Sovyet ordu birliklerinde ve çiftçilerde görülmüştür. 200'den fazla kişinin ölümüne sebep olmuştur. O yıllarda hastalık kene ilişkisi tespit edilmiştir. Kırım Kanamalı Ateşi olarak adlandırılmıştır. 1956 yılında Zaire'de ateşli bir hastada hastalık görülmüş ve Kongo virüsü olarak adlandırılmıştır. Virüsün izolasyonu 1967 yılında Sovyet bilim adamları tarafından Moskova'da hasta kişilerden alınan kanın yenidoğan beyaz farelerin beynine inokülasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 1969 yılında Kongo'da görülen virüs Kırım Kanamalı Ateşi'ne neden olan türlerden ayırt edilememiş ve bu tarihten itibaren hastalık KKKA olarak adlandırılmıştır (15,16). KKKA günümüzde, Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu'da endemik olarak görülebilmektedir. Bu zamana kadar eski Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği ülkelerinde, Bulgaristan, Pakistan, Irak, Dubai, Kuveyt, Birleşik Arap Emirlikleri, Büyük Sahra Çölü'nün güneyinde kalan Afrika ülkeleri ve Kuzey Batı Çin'de epidemiler rapor edilmiştir (15). 1970-2000 yılları arasında Güney Afrika Cumhuriyeti, Kongo, Burkino Faso, Tanzanya, Senegal ve Moritanya, Irak, Pakistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Suudi Arabistan ve Çin'den bildirilmiştir. Türkiye'de ilk defa 2002 yılının ilkbahar ve yaz aylarında başta Tokat, Sivas, Çorum, Amasya, Yozgat, Gümüşhane, Bayburt, Erzurum, Erzincan ve

çevresi olmak üzere İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi'nin kuzeyi ile Karadeniz Bölgesi'nin iç kesimlerini kapsayan geniş bir bölgede keneye temas öyküsü olan, ateş ve kanama ile seyreden bir salgın dikkati çekmiştir, 2003 yılında hastalığın KKKA olduğu anlaşılmıştır (16,168). Sağlık Bakanlığı'nın 2014 yılında yayımlanmış olduğu Halk Sağlığı Faaliyet Raporu'na göre; 2004-2014 yıllarını içine alan 11 yıl süresince ülkemizde 8919 KKKA vakası görüldü, 434 vaka ise ölümlle sonuçlandı. Bu verilere göre ülkemizde KKKA için vaka fatalite oranı; $434/8919*100=4,86$ olarak belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil-1: 2004-2014 Yılları Arasında Görülen KKKA Vaka ve Ölüm Sayıları (168).

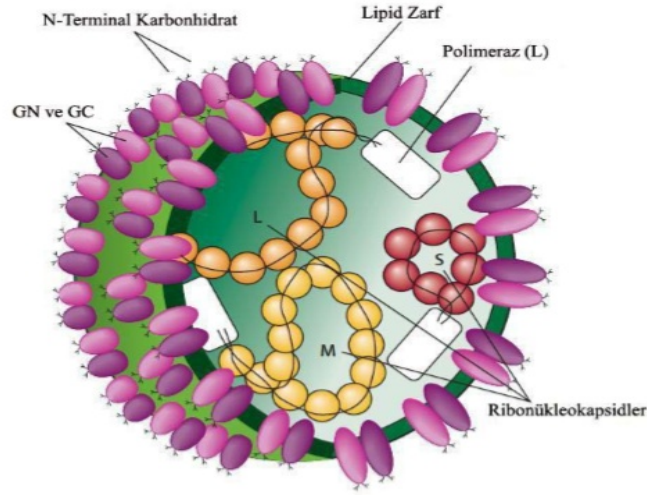


Şekil-2: 2014 Yılı İllere Göre Kırım Kongo Kanamalı Ateşi İnsidansı (168).

Hastalık mevsimsel nitelik gösterir. Eski Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği ülkelerinde en fazla vakanın Haziran ve Temmuz aylarında görüldüğü bildirilmiştir. Güney Afrika Cumhuriyeti'nde vakaların büyük bir çoğunluğu ilkbahar ve sonbaharda görülmüştür. Hastalık genellikle Haziran ve Eylül ayları arasında kendisini göstermesine rağmen, hastalığın mevsimsel özelliğinin bölgelere göre değiştii ve Ocak ayında dahi vakaların görülebildiği bildirilmiştir (17,18). Ilıman geçen kış ayları, tarım faaliyetlerinin azalmasıyla kene popülasyonunda artış ve virüs taşıyan keneleri üzerinde bulunduran göçmen kuşların göç yollarında değişiklik gibi faktörler sonucunda virüsün yayıldığı ileri sürülmüştür (19).

2.1.4 Virüs Mikrobiyolojisi

KKKAV, Bunyaviridae ailesinin Nairovirüs cinsinde yer alır. Bu grupta 34 adet virüs tanımlanmıştır. Nairovirüs, lipid zarflı, tek sarmallı, negatif polariteli bir RNA virüsüdür. Çoğunlukla sferik görünümde ve 80-120 nm boyutundadır. Viral genom dört yapısal proteini kodlayan 3 segmentten oluşmaktadır. Her bir RNA segmenti ile birlikte virüse ait RNA'ya bağımlı RNA polimeraz da bulunmaktadır. Viral genomun L (large) segmenti RNA bağımlı RNA polimeraz'ı ve M (medium) segmenti, Gn ve Gc yüzey glikoproteinlerini, S (small) segmenti de N nükleokapsid proteinlerini kodlamaktadır (2,21), (Şekil 2.1.). Gn ve Gc glikoproteinlerinin duyarlı hücrelerde bulunan reseptör bölgelerini tanımakla görevli olduğu belirtilmiştir. Duyarlı hücrede reseptöre bağlanan virüs vezikül içinde, endositoz yoluyla hücre içine alınır. Virüs replikasyonu sitoplazmada meydana gelmektedir (7). Daha sonra vezikül içinde sentezlenen nükleokapsid vezikülden ayrılır, sitoplazmada serbest hale gelir. Virüs replikasyonunu tamamladıktan sonra, endoplazmik retikulumdan tomurcuklanarak ayrılır ve golgi tarafında sitoplazmik veziküller içine alınırlar. Gn golgi aygıtında, Gc ise endoplazmik retikulumda yer alır. Vezikül içerisindeki asidik ortam etkisiyle glikoproteinlerin üç boyutlu yapılarında değişiklikler meydana gelir. Virüs ile vezikül zarının birleşmesi gerçekleşir. Daha sonra virüs en dıştaki membranı alarak hücre dışına çıkar (7). KKKAV, negatif polariteli sentez fonksiyonu gerçekleştirir. Virüs RNA polimerazı yalnız halde bulunan RNA'yı kalıp olarak kullanamaz. Virüs RNA polimerazı konağın mRNA'larını kullanıp viral genomların mRNA'sını sentezler. Bu mRNA'lardan da ilgili proteinler sentezlenir (23).



Şekil-3: KKKAV genomunun şematik görünümü (8).

Virüslerin genom özellikleri nükleik asit dizi analizleri ile belirlenmektedir. Çoğu nükleik asit dizi analizinde S genom segmenti kullanılırken, son araştırmalarda M genom segmenti de dizi analizinde kullanılmıştır. S segment dizi analizine göre virüs 7 grupta sınıflandırılmıştır. KKKAV'de Avrupa suşları güneydoğu Rusya suşları ile benzer özellikler taşımaktadır. Türkiye'de virüsü taşıyan kene ve hastalardan izole edilen KKKAV'lerin nükleotid sekans analizleri yapılmıştır. Belirlenen KKKAV suşlarına göre, yalnızca bir suş Avrupa 1 grubunda yer almaktadır. Diğer bütün suşlar Avrupa 2 grubu olarak bilinen Doğu Avrupa-Rusya suşları ile beraber aynı grupta yer alır(8,24) Virüsün M segment filogenetik analizlerine göre Türkiye, Rusya ve Kosova suşları ile beraber grup 5'de sınıflandırılmıştır (22).

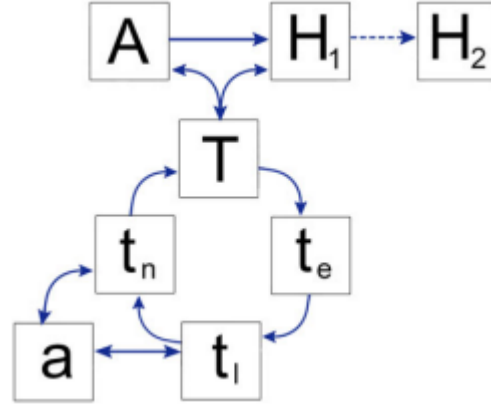
2.1.5 Risk Grupları

Çiftçiler, çobanlar ve hayvancılıkla uğraşanlar, veterinerler ve teknisyenler, endemik bölgede görev yapan sağlık çalışanları ve laboratuvar çalışanları, mezbaha çalışanları ve kasaplar, açık arazide görev yapanlar, orman işçileri, askeri birlikler, kamp yapanlar, mülteciler risk altındadır. Risk altındaki en büyük grup endemik bölgelerdeki tarım ve hayvancılık faaliyetleri ile uğraşan kişilerdir. Türkiye'de görülen olguların %90'ı çiftçidir (9, 26). Virüs hayvanlarda hastalığa sebep olmamaktadır. Fakat hayvanlar viremik olabilir. Çiftlik hayvanları ya da diğer hayvanlarla deri teması sonrası hastalığın görüldüğü bildirilmiştir (7, 8). Veterinerler ve mezbaha çalışanlarının büyükbaş ve küçükbaş hayvanlarla uğraştıkları için risk grubunda olduğu belirtilmiştir (27). Virüsle karşılaşma çoğunlukla

hayvanların kesilmesi esnasında meydana gelir. Bu yolla hastalığa yakalanan olgulardaki en önemli kaynak, enfekte hayvanın viremik kanıdır. Bu işlemler esnasında insanların kenelere karşı korunmasız olması da ihtimal dahilindedir (8). Hayvan etinin dinlendirilmesi veya işlenmesiyle dokulardaki pH'nın düşmesine bağlı olarak virüsün aktivesini kaybettiği belirtilmektedir. Bu nedenle karkas etler bir tehlike arz etmemektedir (28). Sağlık çalışanları en çok etkilenen ikinci gruptur. Sağlık çalışanlarında, KKKA virüsü ile enfekte hastanın kanamalarının olması, nozokomiyal geçiş için ciddi risk oluşturmaktadır. KKKA hastalığının toplumda ortaya çıkmasıyla paralel olarak sağlık çalışanlarına bulaştığı ve ölümlere sebebiyet verdiği bildirilmiştir (8).

2.1.6 Bulaşma Yolları

Hastalık, insanlara kene tutunması sırasında kenelerin kan emmesiyle veya el ile ezilmesiyle, viremik hayvanların vücut sıvıları ve dokuları ile temas ve hasta insanların vücut sıvıları ile bulaşmaktadır. Epidemiyolojik açıdan en önemli bulaşma şekli enfekte kenelerin kan emmek amacıyla insanlara tutunmasıdır (16,30,31). Keneler virüsün doğadaki gerçek taşıyıcısı ve doğal kaynağıdır. Diğer kaynaklar kirpi, fare, tavşan gibi yabani hayvanlar ve kanatlı hayvanlar ile göçmen kuşlardır (16,31). Virüs kenelerde yıllarca kalabilir ve çoğalabilir. Evcil ve yabani hayvanlar ise virüsü sadece bir hafta süreyle taşıyabilmektedir. (20,33,34). Virüs, pek çok evcil ve yabani hayvanı enfekte edebilmektedir. Fakat bu hayvanlarda hastalığa sebep olmadan hafif bir viremiyle seyrederek. Pek çok kuş virüse karşı dirençlidir, ancak virüsün yayılmasında etkili rol üstlenir. KKKA bulaşında Hyalomma türü kenelerin majör rol üstlendiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra 34 dolayında kene cinsinin bu hastalığı bulaştırabileceği belirtilmektedir (32). Hyalomma cinslerinden özellikle Hyalomma marginatum marginatum'un bulaşmada en önemli vektör olduğu tespit edilmiştir. Avrupa, Asya ve Afrika'da KKKA'nın görüldüğü bölgeler Hyalomma cinsinden kenelerin yayılımına uymaktadır (8,12).



t_e , t_l , t_n sırasıyla olgunlaşmamış kenenin yumurta, larva ve nimf formunu temsil eder. Nimf(t_n), KKKA virüsünü küçük memelilere ve kuşlara (a) bulaştırabilir. Geviş getiren hayvanlara ve diğer büyük hayvanlara (A) bulaş erişkin keneler (T) tarafından gerçekleştirilir. Primer insan enfeksiyonları (H_1) kenenin ısırması, vücuda tutunan kenenin ezilmesi (T) yoluyla ya da enfekte hayvanların, özellikle de çiftlik hayvanlarının kan ve/veya vücut sıvılarıyla doğrudan temas sonucu meydana gelir(A). İnsandan insana bulaş (H_1 'den H_2 'ye kesikli çizgi olarak gösterilmiştir) göreceli olarak nadir olmakla birlikte tipik olarak enfekte kan ve/veya vücut sıvılarına maruz kalan sağlık çalışanları ya da enfekte bireylerin yakın akrabalarında görülür.

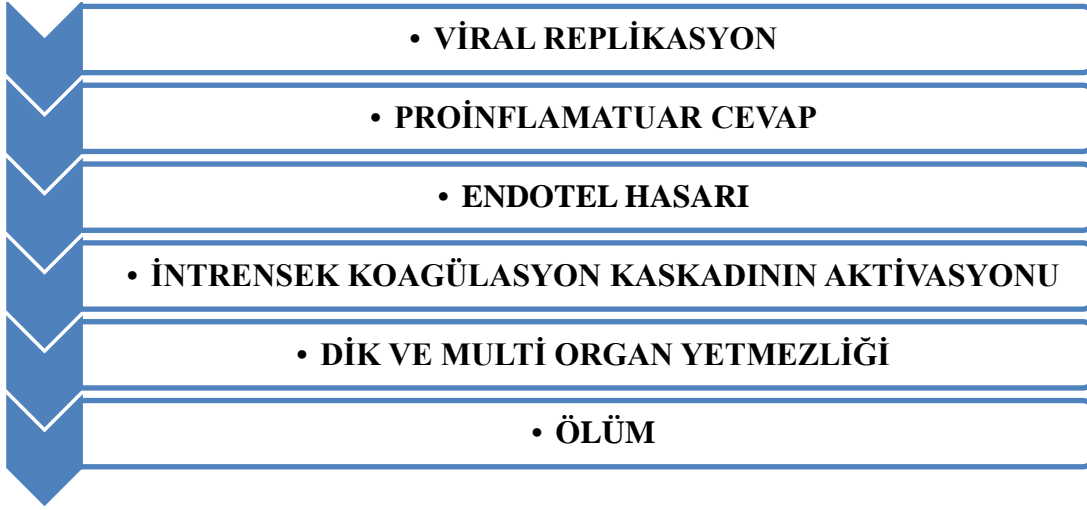
Şekil-4: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Bulaş Döngüsü (149).

Kenenin tutunduğu insanlar en önemli risk grubunu oluşturur. Endemik bölgelerde yaşayan insanlar kenelerin yoğun olduğu alanlardan uzak durmalı, sık sık kene tutunmalarını kontrol etmeli, basit korunma yöntemlerine uymalıdır. Veterinerler, mezbaha çalışanları, hayvancılıkla uğraşanlar, çiftçiler ve endemik bölgelerde görev yapan sağlık çalışanları risk altında bulunmaktadır. Özellikle ağız, burun, dişeti, vajina ve enjeksiyon yerinden kanaması olan hastaların takibi sırasında enfekte kanla karşılaşma sonucunda bulaşma riski %8.7, iğne batması durumunda risk %33 oranındadır. Perkütan temas en yüksek bulaştırıcılığa sebep olmaktadır. Anneden bebeğe geçiş de bildirilmiştir. Laboratuvar çalışanlarının numuneyle teması sonucu bulaş bildirilmiştir (34).

2.1.7 Patogenez

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi'nin patogenezini tam olarak aydınlatılamamıştır. KKKA'nin klinikopatolojisi ile ilgili en kapsamlı çalışma Swanepoel ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. 1981-87 yılları arasında Güney Afrika'da KKKA tanısı almış 50 hasta çalışmaya dahil edilmiş, 50 hastadan 15'i hayatını kaybetmiştir. Mortaliteyle ilişkili durumlar; serebral kanama, şiddetli anemi, şiddetli dehidratasyon, miyokard enfarktüsü, akciğer ödemi

ve plevral efüzyon olarak belirtilmiştir. Ölen hastalarda beyin, karaciğer, böbrek, kardiak ve pulmoner yetersizlik gibi çoklu organ yetmezliği gelişmiştir. Karaciğer biyopsilerinde yaygın nekrotik odaktan masif karaciğer nekrozuna kadar değişkenlik gösteren lezyonlar gözlenmiştir (7). KKKA patogenezi diğer VKA'larla benzerlik gösterir (1). Bulaş sonucunda vücuda giren virüs deride, deri altı dokusunda ya da bölgesel lenf nodlarında çoğaldıktan sonra kana geçer. Başta retiküloendotelial sistem (RES) olmak üzere pek çok organı tutar. Bu organlarda replikasyonunu tamamlar ve sekonder viremi yapar. Mononükleer fagositer sistem uyarılması, sitokin salınımı ve endotel hasarı ile sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) gelişir. Endotel hasarının virüsün direkt etkisinden çok virüsün salgılanmasına yol açtığı proinflamatuvar sitokinler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir (1,7). Endotel hasarı intrinsek koagülasyon kaskadını aktive eder. Trombosit adhezyon ve agregasyonu artar ve sonuçta dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) gelişir. Çoklu organ yetmezlik sendromu (ÇOYS) ve yaygın kanamalar ortaya çıkar (1,35-37). KKKA hastalarında trombositopeni değişmez bulgudur. Nedeni hemofagositoz, kemik iliği hipoplazisi ve endotel hasarına bağlı trombosit yıkımıdır (26,38,39). Virüsün hepatositlere doğrudan sitopatik etkisi karaciğerde yaygın nekroza ve karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Karaciğerdeki hasar nedeniyle pıhtılaşma faktörlerinin sentezi bozulur ve hepatosit yıkımına bağlı olarak serum karaciğer enzim düzeyleri artar (35,36,38,40,41). KKKA hastalarında gelişen aneminin nedeni hemofagositoz, kemik iliği hipoplazisi ve kanamalardır (34,35). KKKA'da proinflamatuvar sitokinlerle ilgili yapılan bazı çalışmalarda proinflamatuvar sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (37,41,44). Dalakta lenfoid hücre azalması, fokal nekroz görülür. Akciğerde diffüz alveolar hasar, alveol içine kanama, hyalen membran oluşumu ve mononükleer interstisyel pnömoni vardır. Myokardda konjesyon ve hafif interstisyel ödem oluşur (36). KKKA'da böbrek tutulumunun ise, sitokinler aracılı intrarenal hemodinamik bozulmaya bağlı olduğu bildirilmektedir (35).



Şekil-5: KKKA Patogenezinin Şematik Gösterimi

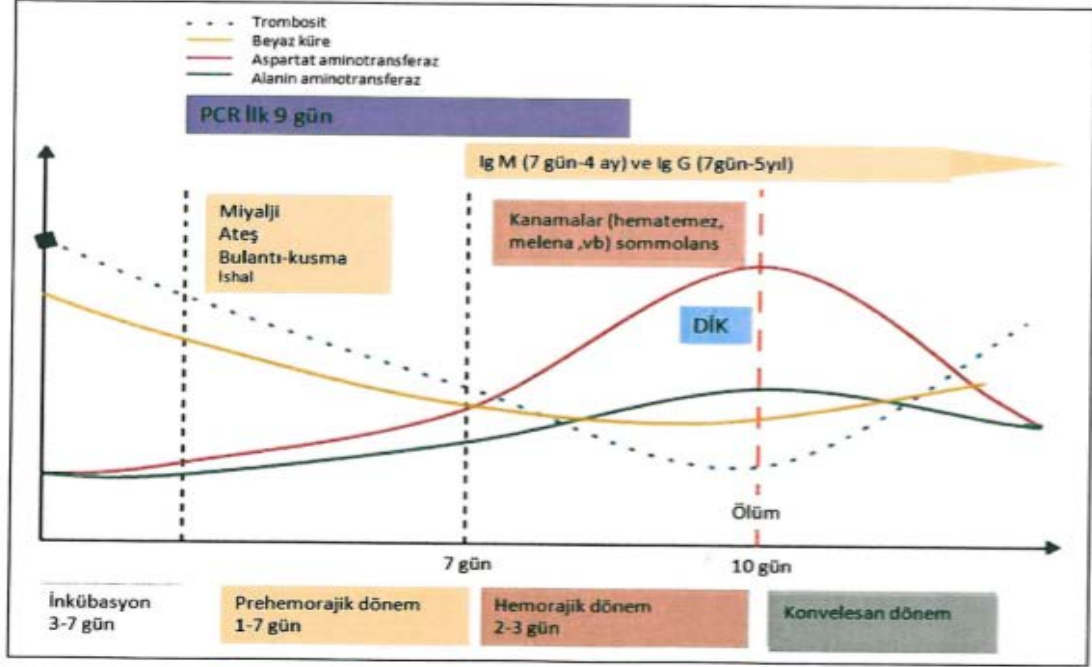
2.1.8 Klinik Özellikler

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi diğer kanamalı ateşlere benzer klinik özellikler gösterir (29). Enfeksiyonu alan her 5 kişiden 1'inde KKKA meydana geldiği bildirilmiştir (7). İnsanlar, KKKA virüsünün hastalık oluşturduğu yegane konaktır (7). KKKA'nın klinik seyri dört dönemden oluşur. Bu dönemler; inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve iyileşme dönemleridir (8). Bu dönemlerin süreleri ve belirtileri büyük oranda değişiklikler gösterebilir.

Tablo 1: Ülkemizde İzlenen KKKA Hastalarının Başlıca Semptomları (168).

Semptomlar	Yüzde(%)
Halsizlik	89.7
Ateş	84.2
Yaygın Vücut Ağrısı	80.2
Baş Ağrısı	75.9
Bulantı	56.2
Kusma	56
Karın Ağrısı	28.2
İshal	27.3
Döküntü	11.6
Kanamalar	8.2
Vücutta Morluk(Ekimoz)	4.9
Kanlı İshal	2.6

Ortalama beş günlük inkübasyon süresinden sonra hastalarda aniden ateş, ciddi baş ağrısı, miyalji, bulantı, halsizlik, ishal ve diğer spesifik olmayan semptomlar başlar. Ciddi olgularda hızlı bir şekilde dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) gelişebilir, kanama ve şok görülebilir (29).



Şekil-6: KKKA'nın Klinik ve Laboratuvar Seyri(8).

2.1.8.1 İnkübasyon dönemi

Kene ısırmasından sonra inkübasyon dönemi, 1-3 gün gibi kısa olabilir. Kan veya çiftlik hayvanı teması ile hastalığa yakalananlarda 5 gün ve insan vakalarının kanıyla temastan sonra 5-6 gündür. Semptomların başlamasıyla hastaneye başvuru arasındaki süre 3,5-5 gün arasında değişmektedir. İnkübasyon dönemindeki değişikliklerin ve hastalığın klinik seyrinin virüsün suşuna veya alınan viral yük gibi diğer faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir (7).

2.1.8.2 Prehemorajik Dönem

İnkübasyon döneminden sonra, prehemorajik dönem; halsizlik, ateş, makülopapüler döküntü, şiddetli baş ağrısı, üşüme, titreme, ışığa hassasiyet ve miyalji ile seyredir (7, 8, 9, 46). Bazı hastalarda ishal, bulantı ve kusma görülebilmektedir (7). Yüzde, boyunda ve

göğüste hiperemi, sklera ve konjunktivalarda kanlanma olabilir. Bazı hastalarda ishalle birlikte karın ağrısı bulunabilir. Prehemorajik dönemin süresi ortalama 3 gündür (1-7 gün) (8). KKKA'da ateş aralıklı ya da kesintisiz olabilir. Genellikle ilk 5 günde ortaya çıkar. Bazı KKKA hastalarında nöropsikiyatrik semptomlar görülmüştür (7). Bradikardi ve hipotansiyon gibi bulgular görülebilir (45).

2.1.8.3 Hemorajik Dönem

Çoğunlukla kısa sürer (2-3 gün) ve hızlı gelişir. Ateşli hastada ateşin yüksekliği ile kanama arasında ilişki bulunamamıştır (8). Kanama müköz membranlarda ve deride peteşiden geniş ekimozlara kadar kendini gösterir (8, 29). Vajinal kanama, diş eti kanaması ve serebral hematoma görülebilir. En sık kanayan bölgeler burun, gastrointestinal sistem (hematemez, melena, intraabdominal kanama), uterus (menometroraji), üriner sistem (hematüri) ve solunum sistemidir (hemoptizi) (7). Aynı zamanda atipik kanamalar da görülebilir (8). Viremi, kanama ve şok başlangıcında düşme eğilimindedir (29). Diğer viral kanamalı ateşlerde olduğu gibi interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinler hastaların serumunda saptanmıştır. Bu sitokin seviyelerinin fatal olgularda fatal olmayanlara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirtilmiştir (29).

2.1.8.4 İyileşme Dönemi (Konvelesan Periyod)

Hastalığı geçirenler için iyileşme süreci, hastalığın başlamasından itibaren iki-üç haftadır. Genellikle uzamış halsizlik, bradikardi, saç dökülmesi, nöropati, baş ağrısı, baş dönmesi, iştahsızlık, görme bozukluğu, hafıza kaybı görülebilir (8). Hepatorenal yetersizlikler Güney Afrika'da bildirilmesine rağmen Türkiye'de görülmemiştir (26). Hastalık geçirenlerde koruyucu bağışıklık gelişmektedir.

2.1.9 Tanı

Erken tanı, hem hasta için hem de nozokomiyal bulaşın önlenmesi için çok önemlidir. Şüpheli olgular muhtemel hasta tanımına uygunluğu bakımından değerlendirmeye tabi tutulmalıdır. Klinik belirtiler, hastanın anamnezi, özellikle endemik bölgelere seyahat, kene

tutunması öyküsü, hasta insan ya da çiftlik hayvanının kan ve/veya dokuları ile temas öyküsü sorgulanmalıdır.

2.1.9.1. Tanıya Yardımcı Laboratuvar Testleri

Trombositopeni KKKAV'nın en sık tespit edilen laboratuvar bulgusudur (7, 8). Hastalarda lökopeni de görülür. Aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve kreatin fosfokinaz (CPK) değerleri yükselmiştir. Hastaların bir kısmında protrombin zamanı (PT), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) ve INR (international normalization ratio) gibi pıhtılaşma testleri uzamıştır. Fibrinojen düzeyi akut fazda artar. Yaygın damar içi pıhtılaşması (YDP) gelişirse fibrinojen düzeyi azalır, fibrin yıkım ürünlerinde artış görülebilir. Sağ kalan hastaların kan sayım, pıhtılaşma ve biyokimya parametreleri gibi laboratuvar testleri yaklaşık 5-9 gün içinde normal değerlerine döner (8).

2.1.9.2 Virüs İzolasyonu

Virüsün izolasyonu ya da kültürüyle ilgili araştırmalar Biyogüvenlik Seviyesi 4 (BSL-4) koşullarını sağlayan laboratuvarlarda yapılmalıdır. KKKAV kültürü için uygulanan yöntem, yenidoğan fareye intraserebral veya intraperitoneal virüs inokülasyonudur. İnokülasyon sonrası virüsten etkilenen fareler 4-6 gün içerisinde ölürlür (48). Virüsü hücre kültüründe üretmek daha basittir ve daha hızlı sonuç verir. Fakat sensitivitesi daha düşüktür. Hücre kültürlerinde, inokülasyondan 4-7 gün sonra izole edilebilmektedir (40).

2.1.9.3 İmmünolojik Yöntemler

KKKAV enfeksiyonunun serolojik tanısı virüs antijenine karşı immün cevap olarak oluşan IgM ve IgG yapısındaki antikorların gösterilmesiyle mümkündür (7, 8). Hem IgG hem de IgM antikorları IFA testi ile virüsün alınmasından yaklaşık yedi gün sonra hastaların serumunda saptanabilir (7). IgM en erken dördüncü günde tespit edilebilmiştir (43). Hastalık sonrası dördüncü ayda IgM antikorları serumda saptanamaz düzeylere iner. İmmünglobülin G titreleri de aynı zamanda düşmeye başlar, fakat beş yıl süresince kanda tespit edilebilir. Enfeksiyonun tanısı; serokonversiyonun tespit edilmesi ya da farklı serum örneklerinde antikor titresinde dört kat veya daha fazla artış olması ya da tek bir örnekte IgM

antikoru tespit edilmesiyle yapılır (7, 8, 29). Ölümcül seyreden olgularda antikor yanıtı nadiren görülür (29). Nötralizasyon antikor testleri ve immünofloresan metodlarla karşılaştırıldığında ELISA yönteminin spesifite ve sensitivitesi hayli yüksektir (8).

2.1.9.4 Moleküler Tanı Yöntemleri

Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) gibi moleküler temelli tanı yöntemleri, tanıya yardımcı tamamlayıcı yöntemlerdir. Günümüzde KKKA'nın, diğer kanamalı ateşlerde olduğu gibi, erken evrede tanısı için kullanılan en önemli testtir. Moleküler temelli yöntemlerin kullanımının faydaları çok fazladır. RT-PZR virüsün genetik materyalini tanıdığı için, ileri düzeyde spesifiktir. Moleküler tanı yöntemlerinin başka bir faydası da; virüs kültürü ile karşılaştırıldığında, numunenin alınmasından sonra sekiz saat içerisinde tanı koymaya yardımcı olmasıdır. Ayrıca RT-PZR viral yükün belirlenmesinde kullanılır. Viral yükün seviyesi hastalığın ciddiyetini gösterir. Viral yük serum seviyelerinin 10^9 genom/mL'nin üzerinde olması durumunda hastalık ölümcül seyreder. Ölümcül vakalarda viral yük ortalaması, yaşayanlardan yaklaşık 1000 defa daha fazladır (47, 49).

2.1.10 Ayırıcı Tanı

KKKA öncelikle diğer VKA hastalıkları olmak üzere, akut gastroenterit, viral ve toksik hepatitler, tifo, şigeloz, falsiparum sıtması, riketsiyoz, leptospiroz, borreliyo, erlişyo, septik şok, toksik şok sendromu, meningokokse, tripanozomiyazis, septisemik veba, kızamık, kızamıkçık, hemorajik çiçek, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), bruselloz, babesiyoz, Q ateşi, diğer riketsiya enfeksiyonları, lyme hastalığı, tularemi, Uzak Doğu ve Orta Avrupa kene-ısırığı ensefalitleri, Kolorado ateşi, Kayalık Dağlar benekli ateşi ile karışabilir. Ayrıca kanama pıhtılaşma bozukluğu ile seyreden non-infeksiyöz tablolardan idiyopatik trombositopenik purpura (ITP), akut lösemi, hemolitik üremik sendrom (HÜS), trombositik trombositopenik purpura (TTP), dissemine intravasküler koagülasyon (DİK), kollagen vasküler hastalıklar ve zehirlenmelerle de karışabilir. Afrika'da Lassa Ateşi ve Filovirüsler, Ebola ve Marburg virüs enfeksiyonları ayırıcı tanıda kesinlikle göz önünde bulundurulmalıdır (7).

2.1.11 Tedavi

Genel destek tedavisi KKKA için ana tedavi yöntemidir. Hastalar hemodinaminin sağlanması, kanama bozukluklarının kontrolü ve solunum desteği açısından yakın takibe alınmalı ve gerektiğinde destek tedavisi verilmelidir (50). Hastaların sıvı ve elektrolit dengesi sağlanmalı, kanama, şok ve DİK bulgularına göre taze donmuş plazma, trombosit ve eritrosit süspansiyonu verilmelidir (51). Şiddetli kanama geliştiğinde tam kan transfüzyonu uygulanmalıdır. Gerekli durumlarda vazopressörler ve inotropik ilaçlar kullanılmalı ve analjezi sağlanmalıdır. İntramüsküler enjeksiyondan ve mecbur kalmadıkça invaziv işlemlerden uzak durulmalıdır. Yapılan bir çalışmada özellikle de ağır hasta grubunda steroidlerin yararlı olduğu belirtilmiştir (52). Trombosit süspansiyonu; kanamalı hastalarda ve cerrahi müdahale uygulanacaklarda trombosit sayısı $<50.000/\mu\text{l}$ ise ve kanaması olmayan hastalarda $<20.000/\mu\text{l}$ ise verilmelidir. Taze donmuş plazma (TDP), fibrinojen seviyesinin 100 mg/dl 'nin altına indiği durumlarda veya $\text{INR} \geq 1,5$ olduğu durumlarda verilebilir. K vitamini verilmesi; yaygın damar içi pıhtılaşması (YDP) gelişen hastalarda, özellikle karaciğer fonksiyonları bozulmuş olanlarda tercih edilebilir. Kanaması olan hastalar tam kan sayımı açısından takip edilmelidir. Hemoglobinin 7g/dl düzeyinin altına inmesi durumunda eritrosit süspansiyonu verilmelidir (8). KKKA tedavisinde kullanılan özgül bir antiviral ajan yoktur. Ribavirin RNA virüslerine karşı kullanılan geniş spektrumlu tek antiviral ajandır. Ribavirinin, *invitro* deneylerde hücre kültüründe virüs replikasyonunu engellediği belirtilmiştir (7,53). Fareler üzerinde gerçekleştirilen deneysel bir araştırmada ribavirinin mortaliteyi büyük oranda azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca yaşam süresinin uzamasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (54). Ribavirinin erken evrede verilmesinin organ hasarını azaltarak hastalığın hafif geçirilmesini sağladığı düşünülmektedir. Bilgiler, kanama başlangıcından sonra ribavirinin etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermektedir (7,33). Enfeksiyonun başlangıcında viremi olması sebebiyle ribavirin daha etkili bulunmuştur. Ribavirinin viral aktivitenin inhibisyonuna yol açarak etkili olduğu gösterilmiştir (56). KKKA'da ribavirin kullanımı halen tartışma konusudur. Ülkemizde yapılmış bir çalışmada ise ribavirinin, KKKA hastalarında klinik seyir ve mortalite açısından olumlu bir etkinliğinin olmadığı gösterilmiştir (55). Oral ribavirinin yanı sıra intravenöz ribavirinin de yapılan bir çalışmada mortalite üzerine olumlu bir katkısının bulunmadığı gösterilmiştir (57). Yine 2013 yılında ülkemizde yapılan bir çalışmada ribavirinin olgu ölüm oranını azalttığı belirtilmiştir (52). Ribavirinin önemli yan etkileri arasında hemolitik anemi, döküntü, kaşıntı, öksürük sayılabilir. Uyku

bozukluğu ve depresyon görülebilir. Embriyotoksik ve teratojenik olması sebebiyle gebelerde kullanılması kontrendikedir (8,13,58,59). Neticede etkinliği üzerinde farklı iddialar olsa da, Dünya Sağlık Örgütü ve Sağlık Bakanlığımızca tedavide ve profilakside ribavirin kullanılması önerilmektedir (55). Maruziyet sonrası, bulaş açısından yüksek risk taşıyan kişilere profilaksi uygulanmalıdır. Özellikle hastaların kan ve/veya vücut sıvıları ile parenteral teması olan kişiler yüksek risk taşımaktadır. Bu durumda yedi gün boyunca, günde dört kez 500 mg oral ribavirin tedavisi uygulanmalıdır (60).

2.1.12 Prognoz

Çocuklar hastalığı yetişkinlere göre daha hafif geçirmektedir. Nazokomiyal kaynaklı hastalığın mortalitesi daha yüksek bulunmuştur. Hastalığı geçirenlerde tekrar bir KKKA görülmez. Tam bağışıklık sağlanır (51). Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığında farklı araştırmacılar çeşitli klinik ve laboratuvar verilerini prognostik faktör olarak öne sürmüşlerdir. Swanepoel ve arkadaşları hastalığın klinik semptomlarının başlamasından sonraki ilk beş gününde aşağıdaki laboratuvar değerlerinden en az biri varsa şiddetli vaka, hiçbiri yoksa hafif vaka olarak tanımlamış ve bu bulgulardan en az birinin var olması durumunda hastalığın %90 ölümle sonuçlandığını belirtmişlerdir. Kan lökosit sayısı $\geq 10 \text{ bin/mm}^3$, kan trombosit sayısı $\leq 20 \text{ bin/mm}^3$, AST değeri $\geq 200 \text{ IU/L}$, ALT değeri $\geq 150 \text{ IU/L}$, aPTT $\geq 60 \text{ sn}$ veya fibrinojen seviyesi $\leq 110 \text{ mg/dl}$ (20). Başka çalışmalarda, AST $>700 \text{ U/L}$ ve ALT $>900 \text{ U/L}$ değerinin yüksekliği (17), aPTT ve PT uzaması, trombosit sayısının 20000 altına düşmesi, LDH düzeylerinde artma olması, hastanın halsizlik, miyalji, uyku hali şikayetlerinin olması, kanama varlığı, fatalite için risk faktörü olarak düşünülmektedir (63). Ense sertliği, konfüzyon, birden fazla bölgede kanama ve uzun süren ateş varlığı (61), şuur bozukluğu, splenomegali, somnolans, hematemez, melena, DİK ve böbrek yetmezliği gelişmesi klinik olarak tanımlanmış kötü prognoz kriterleridir (62).

2.1.13 Korunma ve Kontrol

Hastalığı oluşturan virüsle temastan kaçınmak en önemli noktadır. Kenelerle mücadele virüsten korunmada etkilidir. Fakat keneleri tümüyle yok etmek mümkün değildir. Bunun yanında konak olabilen çiftlik hayvanlarının düzenli ve uygun biçimde ilaçlaması yapılmalıdır. Hayvancılıkla uğraşanlar, veterinerler, mezbaha işçileri eldiven ve uzun önlük

kullanmalıdır, enfekte doku ve kan ile temas etmekten kaçınmalıdır (8). Mükün olabildiğince kenelerin bulunduğu ortamlardan uzak durulmalıdır. Bu bölgelerde bulunulduğunda vücut kene için taranmalı, eğer kene bulunursa uygun bir şekilde hemen çıkarılmalı (ezilmeden ve ağız kısmı koparılmadan, eldiven giyerek). Kenelerin olabileceği alanlarda çizme giyilmeli ve pantolon paçaları çorapların içine alınmalıdır (58). Sağlık çalışanları özellikle ağız, burun, dişeti, genitoüriner sistem ve enjeksiyon yerinden kanaması olan hastalara müdahale ederken standart izolasyon önlemlerine dikkat etmelidir. Eldiven, önlük, maske, gözlük gibi bariyer önlemleri kullanılmalıdır. Girişimsel uygulamalar mümkün olduğunca en aza indirilmelidir (58,60). Tanı almış veya muhtemel KKKA vakaları izole edilmeli, hasta bakım hizmeti sunacak ekip ve hasta yakınları eğitilmelidir (55).

2.2 Oksidan/Antioksidan Sistem

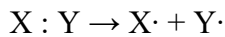
2.2.1 Serbest Radikaller: Tanım ve Oluşum Mekanizmaları

Oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri organizmaya yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir. Serbest radikaller; bir veya birden fazla eşlenmemiş elektronlara sahip moleküller olarak adlandırılır. Çeşitli moleküllerin sağ üst köşesine konumlandırılan nokta sayısı eşlenmemiş elektron sayısını ifade eder (63).En iyi bilinen ve en sık meydana gelen serbest radikaller, moleküler oksijende meydana gelen değişimler sonucu oluşur. Bunlar serbest oksijen radikalleri (reaktif oksijen radikalleri) olarak adlandırılır. Daha sonrasında 'reaktif oksijen partikülleri' terimi kullanılmaya başlanmıştır.Bu terim ise reaktif olmayan oksidanları da kapsamaktadır (64). Oksijen 8 atom numaralı ve doğada dioksijen (O_2) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Oksijen molekülündeki aynı yöne dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerin herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçerse veya aynı yönde dönmeyi bırakıp farklı yönde dönerse " singlet oksijen " meydana gelir. Orbitallerden birisine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha eklenirse son durumda "oksijen radikali" oluşur. Oluşan oksijen radikali, eşleşmemiş elektrona sahip olduğundan dolayı çok kararsız bir yapıya sahiptir. Bu kararsız durum oluşan radikalın tek elektronunu bir başka moleküle aktarmasıyla (redüksiyon), veya bir başka molekülden tek elektron alıp elektron çifti oluşturmasıyla (oksidasyon) sonuçlanabilir (65, 66). Oluşan radikaller çok reaktif ve aynı zamanda anstabilidir. Diğer moleküllere elektron

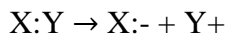
verebildiklerinden ve de diğer moleküllerden elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici ve yükseltgeyici bir davranışta bulunurlar (67, 68). Serbest radikaller organizmada fizyolojik olarak normal metabolizma sonucunda meydana gelebileceği gibi; aynı zamanda ısı, ışık, radyasyon, ultraviyole gibi çeşitli dış etmenlerin etkisiyle de meydana gelebilir. Serbest radikaller tüm canlı hücrelerde fizyolojik miktarlarda üretilirler. Aşırı üretildiklerinde ise hücre ve doku hasarına sebebiyet verirler. Serbest radikallerin bu zararlı etkileri antioksidan adı verilen enzim ve moleküller tarafından ortadan kaldırılır. Bütün organizmalarda serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizmaları arasında hassas bir denge vardır. Oksidatif stres; serbest oksijen radikallerinin üretimi ile bunların antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılması arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Serbest radikal tepkimeleri protein, lipit ve karbonhidratların oksidasyonuna, ayrıca DNA hasarına neden olarak çeşitli zararlara yol açarlar (69). Hücre ve dokularda meydana gelen serbest radikallerin en önemlisi oksijen radikalleridir. Serbest oksijen radikalleri hücre metabolizmasında oksijen içeren pek çok biyokimyasal indirgenme reaksiyonları neticesinde meydana gelmektedir (70,71). Bu kimyasal reaksiyonlar sırasında oksijen, elektron transport zincirinde suya kadar indirgenirken her basamakta serbest oksijen radikalleri meydana gelmektedir. En önemli serbest oksijen radikalleri şunlardır: $O_2\cdot$ (Süperoksit radikali), H_2O_2 (Hidrojen peroksit), $OH\cdot$ (Hidroksil radikali), $O_2\uparrow\downarrow$ (Singlet Oksijen) (71).

Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak sürekli yapılırlar. Serbest radikaller 3 yolla oluşurlar:

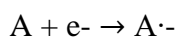
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı meydana getiren her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikal değil, iyonları oluşur.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun ilave edilmesi



Organizmada oksidatif strese neden olan radikallerin yapımı endojen ve çevresel faktörlere bağlı birtakım mekanizmalarla gelişir. Endojen faktörler; mitekondriyal sızıntı,

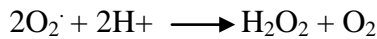
enzim reaksiyonları, solunumsal patlama ve otooksidasyon tepkimeleridir. Çevresel faktörlerin en önemlileri ise sigara dumanı, ultraviyole ışınları, hava kirliliği, iyonize radyasyon ve ksenobiotiklerdir (74). Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri moleküler oksijen ve onun reaktif türleri (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali), peroksitler ve geçiş metallerinin olduğu tepkimelerdir (75).

2.2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Normal şartlar altında oksijen kararlı, renksiz, kokusuz, tatsız, sudaki çözünürlüğü kısıtlı bir gazdır. Oksijen insan için hayati olduğu kadar, aynı zamanda toksik bir moleküldür. Oksijenin iki eşlenmemiş elektronlarının farklı orbitallerde aynı yönde dönmesi sonucu oluşan Oksijen bir radikaldir. Moleküler oksijen elektron transferiyle suya kadar indirgenir. 4 elektron kullanılan bu yolda reaktif ara moleküller meydana gelir. Bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Bu moleküller önemli oksidatif stres ajanları olup reaktif oksijen türleri olarak adlandırılır (76).

2.2.2.1 Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyonla ATP üretimi açısından önemli bir fayda sağlarken, bazı tehlikeleri de beraberinde getirir. Oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan oksijene bir elektron eklenmesiyle süperoksit radikali oluşur (77). Canlılarda olduğu gösterilen ilk radikal olan süperoksit radikali aktivitesi fazla olmayan bir serbest radikal türevidir olup H₂O₂ kaynağıdır. Yükseltgen ve metal iyonlarını indirgeyici etkisi vardır. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonuçlanır. Aktive olan fagositik hücrelerden bol miktarda süperoksit üretilir. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatmaktadır (79,80). Süperoksit, hidrojen peroksit ve moleküler oksijenin olduğu dismutasyon reaksiyonuyla sulu ortamda hızlıca yok olur. Süperoksit Dismutaz enzimiyle katalizlenen dismutasyon reaksiyonu spontan dismutasyondan 10⁹ kat daha hızlıdır. Oluşan Hidrojen peroksit kendisi serbest radikal olmasa da en reaktif serbest radikal türlerinden biri olan hidroksil radikale otooksidasyon yolu ile dönüşebilir (78).



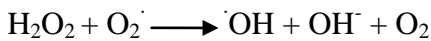
2.2.2.2 Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit radikal olmamasına rağmen, biyolojik membranlara nüfuz edebilmesi ve daha radikal oksijen türlerinin oluşumu esnasında üstlendiği görevden dolayı önemlidir. Diğer bir mühim görevi de hücre içi sinyal molekülü olarak görev almasıdır (76). Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucunda oluşmaktadır. Dismutasyon spontan olarak veya süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla olabilir. Ürat oksidaz, glukoz oksidaz, d-aminoasit oksidaz gibi birçok enzim oksijene iki elektron vererek Hidrojen Peroksit oluşturabilir (72). H₂O₂ membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir. H₂O₂ özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturabilmektedir. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipit peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir (65,79).

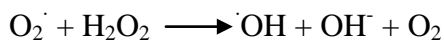
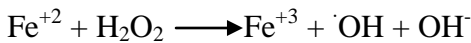
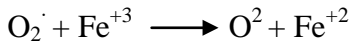
2.2.2.3 Hidroksil Radikali (HO⁻)

Hidroksil radikalının majör oluşum mekanizması suyun yüksek enerji ile iyonizasyonudur. $H_2O \longrightarrow \cdot OH + e_{aq-} \longrightarrow H_2O_2$

Hidrojen peroksit ise süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali meydana getirmek üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu tepkimeye Haber-Weiss tepkimesi denir ve tepkime katalizörsüz ortamda birhayli yavaş iken, demir katalizörlüğünde çok hızlıdır (79).



Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en kuvvetli serbest radikaldir. Dokuların radyasyona maruziyeti sırasında, enerjinin büyük çoğunluğu hücre içindeki su

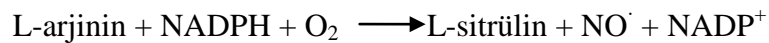
tarafından absorbe edilir. Radyasyon oksijen ve hidrojen arasında kovalent bağa neden olur. Sonuçta iki radikal meydana gelir. Bu radikallerden biri hidrojen (H-) ve diğeri ise hidroksil radikalidir (OH-). Yine OH- radikalleri aromatik halkaya katılma özelliklerinden dolayı DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşmasına sebep olurlar. Çeşitli reaksiyonlara katılabilen OH- radikalleri DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA zincir kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok şiddetli olursa hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda çeşitli mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (66).

2.2.2.4 Singlet Oksijen (↑↓)

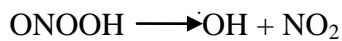
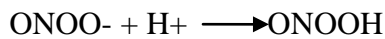
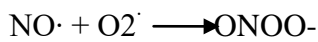
Singlet oksijen eşlenmemiş elektrona sahip olmadığından serbest radikal değildir. Bununla birlikte dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif şeklidir (79). Moleküler oksijende paylaşılmamış iki dış elektron aynı yönde, farklı yörüngelerdedir. Singlet oksijende ise elektronların dönme yönleri birbirine zıttır. Oluşturdukları delta ve sigma formuna göre aynı veya farklı yörüngelerde bulunurlar. Aynı yönde ise delta singlet oksijenden, farklı yörüngelerde ise singlet oksijen formundan bahsedilir. Sigma formu delta formuna göre daha enerjetik olup kolaylıkla delta formuna dönüşebilir (68).

2.2.2.5 Nitrik Oksit (NO')

NO enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.



NO eşlenmemiş elektron bulundurmasına rağmen biyomoleküller ile kolaylıkla reaksiyona giremez. Diğer yönden peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girerek daha az reaktif moleküller meydana getirirler (76). Yüksek miktarda O_2' yapımı NO' ile paralellik gösterir. Birbirlerini etkileyerek OH ve NO_2 oluşumuna neden olurlar. Reaksiyon sırasında ise peroksi nitrit (ONOO-) ve peroksi nitroz asit ara ürünleri meydana gelir (76).



Tablo-2: Radikal ve Radikal Olmayan Oksijen Türevi Bileşikler

OKSİJEN TÜREVİ BİLEŞİKLER	
RADİKALLER	RADİKAL OLMAYANLAR
Hidroksil (HO [·])	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO [·])	Singlet Oksijen (O ₂ ^{↑↓})
Peroksil (ROO [·])	Ozon (O ₃)
Süperoksit (O ₂ ^{·-})	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik Oksit (NO [·])	Lipidhidroperoksit (LOOH)
Azot Dioksit (NO ₂ [·])	Peroksinitrit (ONOO [·])

2.2.3 Serbest Radikallerin Etkileri

2.2.3.1 Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit dizilimine göre farklılık gösterir. Proteinlerin sülfidril ya da amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşimi sonucu proteinlerde meydana gelen yapısal değişiklikler üçe ayrılır: 1-Aminoasitlerin modifikasyonu, 2- Proteinlerin fragmantasyonu, 3- Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalardır (82).

Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesinde ve proteolize olan hassasiyetinde değişmeye yol açabilir. Reaktif oksijen türleri, membrandaki proteinler ile reaksiyona girebilir. Enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına yol açabilirler. Reaktif oksijen türleri, disülfid bağından zengin immünglobulin ve albümin gibi proteinlerin üç boyutlu yapılarının bozulmasına neden olur. Bu nedenle normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hem proteinleri de reaktif oksijen türlerinden önemli ölçüde zarar görürler. Özellikle okside olmuş hemoglobinin O₂ veya H₂O₂ ile tepkimeye girmesi methemoglobin oluşumuna neden olmaktadır (81).

2.2.3.2 Nükleik Asitlere Etkileri

Nükleik asitler, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu değişimlere oldukça duyarlıdır. Hidroksil radikallerinin DNA ile reaksiyonu sonucunda baz modifikasyonları, delesyonlar, zincir kırılmaları oluşabilmektedir. Reaktif oksijen metabolitleri, oksidatif yarılma ile DNA'da hasara neden olabilmektedir. Özellikle pirimidin bazlarından timin en duyarlı yapıdır. DNA halatlarının kopması, DNA çift sarmalının açılması sonucu hücrede mutasyonlar ve ölüm gerçekleşebilmektedir. 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OhdG), oksidatif DNA hasarının bir göstergesidir. Yenidoğanlarda ve hipoksiye maruz kalan bebeklerde oranının arttığı belirtilmektedir (83).

2.2.3.3 Karbonhidratlara Etkileri

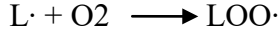
Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler orataya çıkmaktadır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu; katarakt, diyabet ve sigara içimiyle ilgili kronik hastalıkların, inflamatuvar eklem hastalıklarının oluşumuna katkıda bulunabilir (84). Reaktif oksijen türleri bağ dokusunun önemli bir bileşeni olan hyalüronik asit gibi karbonhidratların parçalanmasına da yol açabilir (77).

2.2.3.4 Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Biyolojik membranların yapısında lipid ve protein bulunmaktadır. Lipit peroksidasyonu lipitlere olduğu kadar membran proteinlerine de zarar verir (68). Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma reaksiyonlarına verilen isimdir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler hücre membranının geçirgenliğini ve akışkanlığını önemli ölçüde etkiler (77,79). Zincir reaksiyonu biçiminde olan lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest radikallerin etkisiyle çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar. Bu reaksiyon başlangıç reaksiyonu olarak adlandırılır. Hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile karbon atomu üzerinde eşleşmemiş elektron kalır ve bunun sonucunda yağ asidi lir lipit radikali (L·) özelliği kazanır.



Oluşan lipit radikalının molekül içi çift bağlarının pozisyonunun değişmesiyle konjuge dienler oluşur. Bir alkenin iki çift bağı arasında bir tane tekli bağ varsa bu yapı konjuge dien olarak adlandırılır. Lipit radikalının moleküler oksijen ile etkileşimi sonucu lipit peroksil radikali (LOO) oluşur.



Peroksil radikali diğer komşu yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşmasına sebep olurken kendisi de açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipit hidroksiperoksitlerine(LOOH) dönüşür. Böylece peroksidasyon başladıktan sonra kendiliğinden yayılabilmekte ve çok sayıda yağ asidi zinciri lipit hidroperoksitlerine dönüşebilmektedir. Bu reaksiyon ilerleme reaksiyonu olarak adlandırılır (77,79,85,86,87).

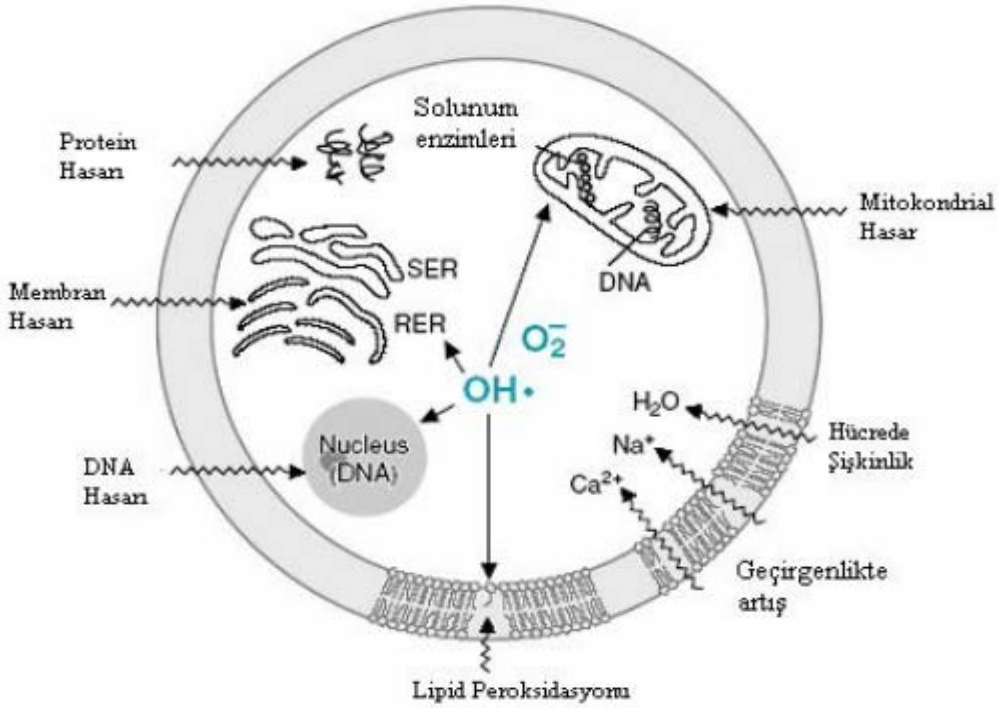


Oldukça kararlı olan lipit hidroperoksitleri lipit peroksidasyonunun ilk ürünüdür. Geçiş metalleri varlığında lipit hidroperoksitleri bu metallerin redoks döngüsüyle birlikte lipit peroksidasyonunu başlatabilecek radikallerin oluşumuna sebep olabilirler. Hasar ile membran geçirgenliğinin değişmesi, anormal kalsiyum iyonu girişine yol açarak hücre fonksiyonların bozulmasına ve oksidasyon ile fosforilasyonun ayrılmasına neden olur. Ayrıca ortamdaki demir ve bakır gibi metal iyonları, lipid peroksitlerinin sitotoksik ürünlere dönüşümünü hızlandırır (71).

Lipit peroksitlerinin yıkımı ile biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur ki bu ürünler, hücre içine yayılarak, hasarın hücrenin diğer kopartımanlarına da sıçramasına sebep olurlar. Lipit peroksidasyonunun son bileşeni olan Malondialdehit(MDA), peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle oluşan üç karbonlu bir dialdehittir ve oksidatif durum belirteci olarak yaygın olarak kullanılır. Bu dialdehit biyolojik ortamlarda moleküllerin amin ve/veya sülfidril gruplarına bağlı veya serbest olarak bulunur (77,88). Oluşan MDA; iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirerek mutajeniteye, genotoksisiteye ve karsinojeniteye katkıda bulunabilir (81).

2.2.4 Antioksidan Mekanizmalar

Organizma içindeki radikaller, geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açan bir çok reaksiyona sebep olur (Şekil 7). Süperoksit ve hidroksil radikalleri hücre zarında, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum zarlarında lipit peroksidasyonunu başlatır. Membran geçirgenliğinde değişikliğe sebep olurlar. Geçirgenlikteki artış mitokondriyal hasara neden olan hücre içi Ca^{+2} artışına neden olur.



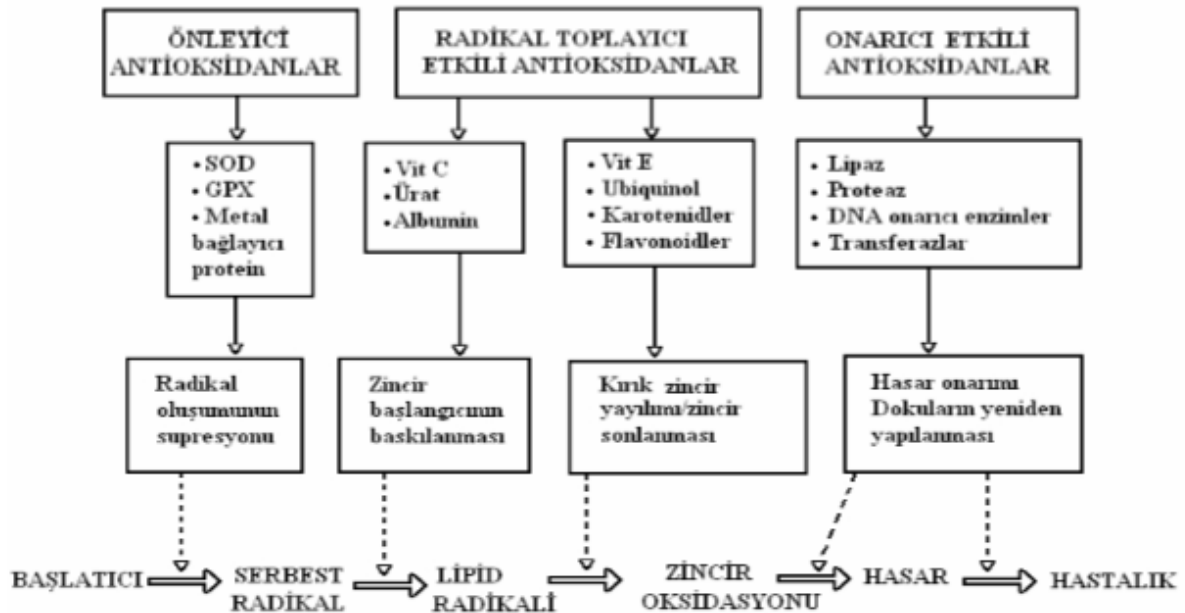
Şekil-7: Radikallerin Yol Açtığı Hücre Hasarı

Hücre ve organ sistemlerini reaktif oksijen türlerine karşı koruyabilmek için organizmada endojen ve eksojen yerleşimli, birbiriyle uyum halinde çalışan çeşitli bileşenler bulunur. Antioksidan sistem olarak adlandırılan bu mekanizma, hasar öncesi radikal oluşumunu önler, oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve mutasyonları önler (79). Oksitlenebilir bir substratla (protein, lipit, karbonhidrat ve nükleik asitler) karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonlarda substratın oksidasyonunu belirgin biçimde geciktiren/önleyen bileşiklere antioksidan denir (90). Bir başka tanımla diyetset antioksidan normal fizyolojik fonksiyonlar sırasında oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi reaktif türlerinin yan etkilerini belirgin biçimde azaltan ve yiyeceklerde var olan maddeler olarak

adlandırılır (91). Fakat bu tanım tekrar gözden geçirilmiş ve genişletilerek membran stabilitesini koruma özelliğinin de antioksidanların fonksiyonlarından biri olduğu bildirilmiştir (92).

Antioksidan savunma sistemleri etkilerini gösterme mekanizmaları (Şekil 8):

- 1- Hasarlı hedef moleküllerin yerini alma,
- 2- Reaktif oksijen türleri oluşumunu minimumda tutma,
- 3- Hasarlı hedef moleküllerin onarımı,
- 4- Yüksek düzeyde reaktif türlerin oluşumunda görev alan metal iyonlarını bağlama,
- 5- Reaktif türleri enzim kullanarak ya da bizzat kendisinin yer aldığı tepkimelerle temizleme (93).



Oksijenli solunum yapan canlılarda pek çok antioksidan sistem bulunmaktadır. Bu antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılır. Endojen antioksidanlar, enzim olarak görev yapanlar ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki grupta incelenmektedir. Enzim olan antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz, glutatyon-S- transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemidir. Enzim olmayanlar ise; bilirubin, albümin, ürik asit, selenyum α - tokoferol, askorbik asit, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadırlar (94,95). Eksojen antioksidan

olarak da allopurinol, folik asit, C vitamini, E vitamini, asetilsistein, mannitol, adenozin, flavonoidler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar ve demir şelatörleri sayılabilir (96).

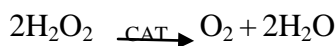
2.2.4.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Reaktif oksijen metabolitlerine karşı primer antioksidan enzim süperoksit dismutazdır. Aminoasit dizilimine, aktif metal bölgesine ve hücresel dağılımlarına göre üç farklı formu vardır (89). SOD enziminin bakır-çinko, mangan ve demir içeren üç tip izoenzimi bulunur. Bakır-çinko içeren Cu-Zn-SOD sitozolde, mangan içeren Mn-SOD mitokondride faaliyet gösterir. Cu-Zn-SOD ve Mn-SOD aynı mekanizmalarla etki gösterir fakat Mn-SOD pH 7'nin üzerinde aktivitesini kaybeder. Cu-Zn-SOD'un aktivitesi pH 5.5-10 aralığında değişmez. SOD, substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanan ve süperoksiti hidrojen peroksit çeviren bir metalloenzimdir. Bu reaksiyon "oksidatif strese karşı ilk savunma" olarak bilinir. Çünkü süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarını başlatan kuvvetli bir tetikleyicidir. Bu sistem sayesinde hücresel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulur. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (71).



2.2.4.2 Katalaz

Katalaz birçok organizmada bulunan ve hem içeren homotetramerik bir enzimdir. Peroksizomda yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir enzimdir (69,70). Katalaz tüm prokaryot ve ökaryot canlılarda bulunur. Her sübünitinde bir hem grubu ve NADPH molekülü içerir. NADPH molekülü katalazın yüzeyine yakın ve sıkıca bağlı şekilde bulunur. Bu kofaktörün peroksitin oksijene dönüşümünde katalazı inaktiviteden koruduğu ve etkisini artırdığı belirtilmiştir (89). Katalaz hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler.



Katalaz ayrıca fenol, alkol gibi farklı substratların, hidrojen peroksidin çift redüksiyonu ile detoksifikasyonunu sağlar.



Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliğinde NADPH'ın olgun eritrositlerdeki düşüklüğünün katalazda inhibisyona neden olduğu ve hemolizin GSH-Rd/GSH-Px'den çok katalazdan kaynaklandığı düşünülmektedir (76).

2.2.4.3 Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd)

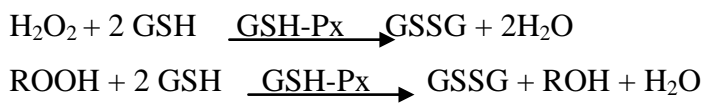
Hidrojen peroksidin indirgenmesi sırasında GSH oksitlenir. GSH-Px'in fonksiyonunun devam edebilmesi için okside glutasyon tekrar indirgenmelidir. Okside Glutasyon (GSSG) NADPH bağımlı bir flavoenzim olan Glutasyon Redüktaz tarafından redükte formuna (GSH) indirgenir (71).



Glutasyon redüktaz otozomal dominant olarak kalıtılır. 8. kromozom üzerindedir. Dokulardaki dağılımı glutasyon peroksidaz ile benzerdir. Glutasyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gerekli bir moleküldür ve majör kaynağı pentoz fosfat yoludur (85).

2.2.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, pek çok hücrenin sitozolünde bulunan bir enzimdir ve hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumludur. Sitozol ve mitokondrilerde SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 ve yağ asidi hidroperoksidlerini ortadan kaldırmaktadır. Düşük H_2O_2 konsantrasyonunda çalışmaktadır. Kofaktör olarak selenyum elementini kullanır.



Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesiyle oksitlenen glutatyon, glutatyon redüktaz enzimi ve başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar (71). GSH-Px, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu, fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H₂O₂'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. Yapılan çalışmalarda kord kanı GSH-Px ve total antioksidan düşüklüğü olan bebeklerde DNA hasarının yüksek olduğu gösterilmiş ve doğumda oksijen radikallerinin oluşumunun arttığı ifade edilmiştir (97).

2.2.4.5 Glutatyon-S-Transferaz (GST)

GST iki sübüniteden oluşmuş dimerik bir proteindir. Bu sübünitelerden her biri glutatyon bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve buna komşu elektrofilik substrata bağlanan nispeten hidrofobik olan bölge içerir. Bunun yanında çeşitli izoenzimlerde transport veya düzenleyici fonksiyonu olduğu düşünülen substrat bağlanmayan bölge de belirlenmiştir. GST memeli türlerinde elektrofilik bileşenlerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen izoenzimlerin oluşturduğu çoklu bir gen ailesinden oluşur; alfa, mu, teta, pi, zeta, sigma, kappa ve omega olarak gösterilen 8 gen sınıfı ile düzenlenmiştir. GST enziminin alfa ve teta sınıfları lipid peroksitlerine karşı selenyumdan bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi göstermektedir.



Antioksidan aktivitesine ek olarak bazı biyokimyasal fonksiyonları da vardır. Bilirubin, hem ve kortikosteroidler gibi endojen maddelere geri dönüşsüz olarak bağlanarak bunların hücre içi transportunda da görev almaktadır (71).

2.2.4.6 Glutatyon (GSH)

Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşur. Hücrede en fazla tiyol grubuna sahip bileşiktir. GSH sentezinde sistein kaynağı olarak N-asetilsistein kullanılır. Glutaminin glutaminaz ile hidrolizi ve α -ketoglutarat ile dallı zincirli aminoasitlerin transaminasyonu ile

oluşan glutamat; sentezde kullanılan temel glutamat kaynaklarıdır. GSH'dan kaynaklanan glutatyon radikali (GS-) bir prooksidandır. Ancak iki GS birleşerek okside glutatyonu (GSSG) oluştururlar, bu da GSH-Rd tarafından GSH'ya indirgenir. Doğrudan yada dolaylı yollardan serbest radikalleri temizler. Hücrel redoks dengesinin ayarlanmasında önemli görevleri olan tiyol gruplarıyla etkileşim halindedir (98).

2.2.4.7 Tiyoredoksin Sistem

Tiyoredoksin sistem oksidoredüktaz enzim aktivitesi gösteren içerisinde tiyoredoksin (Trx) ile Tiyoredoksin Redüktazın (TrxR) yer aldığı iki antioksidan enzim sisteminden oluşur. Memelilerde ve prokaryot canlılarda bulunur. Tiyoredoksin Redüktaz NADPH'ın kullanıldığı bir reaksiyonla tiyoredoksinin disülfid aktif bölgesini ve birçok substratı redükler. Tiyoredoksinin immün sistemin düzenlenmesiyle ilişkili olduğu ve farklı genler tarafından kodlanan üç izoenzimi olduğu gösterilmiştir. Tiyoredoksin redüktaz izoenzimleri, her sübünitesinde bir FAD bulunduran NADPH bağımlı oksidoredüktazlardır. Tiyoredoksin Redüktazın saflaştırma işlemi ilk olarak 1977 yılında yapılmıştır (76).

2.2.4.8 C Vitamini

C vitamini vücutta birçok çok biyolojik fonksiyon için gerekli suda çözünebilen bir vitamindir. C vitamini kollajen hidrosilasyonu, karnitin sentezi, dopaminin norepinefrine dönüşümü, peptid amidasyonu ve tirozin metabolizmasında görevli enzimlerin kofaktörü olarak görev yapar. C vitamini güçlü bir indirgeyicidir ve biyolojik sistemlerde serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapar (97). Biyolojik sıvılarda en çok bulunan ve suda çözünen bir antioksidandır. Süperoksit, hidroperoksit radikalleri ve singlet oksijen ile peroksinitrit, nitrojen dioksit ve nitroksit radikallerini toplayabilme özelliğine sahiptir. Paradoksal olarak C vitamini in vitro koşullarda bir prooksidan gibi davranabilir. C vitamininin demir ve bakır ile birlikteliği lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif modifikasyonunu indüklemek için kullanılmaktadır (91). C vitamini oksidatif strese ferrik demiri ferroz demire indirgeyerek ve sonrasında H₂O₂'in hidroksil radikaline dönüşümünü sağlayarak neden olabilir. Ancak genel olarak bu C vitamini aracılı Fenton reaksiyonları, insanda ferritin ve transferin gibi metal bağlayıcı proteinlerin etkin demir tutulumu sayesinde kontrol edilir. (91,100). İnsan plazmasının in vitro inkübasyonu ile gerçekleştirilen çalışmalarda C vitamininin geçiş

elementleri ve Hidrojen peroksit eklenmesi durumunda bile lipid peroksidasyonunu önlediği belirtilmiştir (101).

2.2.4.9 Karotenler (A vitamini)

Alkoller(retinoller), aldehitler(retinaler) ve retinoik asitler başta olmak üzere A vitaminin çeşitli türleri bulunur. A vitaminin en potent ve en yaygın türü β -karoten' dir. Suda çözünmeyen bu molekül havada okside olarak inaktif ürünler oluşturur (103). A vitamini; antioksidan özelliğinin yanında membran bütünlüğünün sağlanması, yara iyileşmesi, epitel dokunun bütünlüğünün sürdürülmesi ve glikoprotein sentezinde çeşitli görevler üstlenir (103).

2.2.4.10 Tokoferoller (E Vitamini)

α , β , γ , δ olarak dört farklı tokoferol formu bulunur. Biyolojik açıdan en çok bulunan ve en aktif E vitamini şekli α -tokoferoldür. Yağda çözünebilen fakat suda çözünemeyen bu bileşikler oksijensiz ortamda asit ve sıcaklığa dayanıklıdır (104). Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi membrandan zengin hücre organellerinde vitamin E derişimi artmıştır. Kuvvetli bir antioksidan olan alfa tokoferol hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal saldırılarına karşı korur, oluşan radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder (102).

2.2.4.11 Melatonin

Melatonin, memelilerde başlıca pineal bezden salgılanır. Ayrıca lens, kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanır. Uyku, üreme gibi pek çok yaşamsal fonksiyonun düzenlenmesinde görev alan bir hormondur. Melatoninin oksidatif strese yol açan serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önlediği bildirilmiştir (106).

2.3 Isı Şok Proteinleri

2.3.1 Tanım

İlk olarak 1962 yılında F. Ritossa tarafından keşfedilen Isı Şok Proteinleri (HSP), 30 dakika süreyle 37°C ısıya maruz bırakılıp; daha sonra 25°C ısıya düşürülen *Drosophila Melanogaster* (sirke sineği) tükrük bezi hücrelerindeki kromozomal kümelenmelerde tariflenmiştir (107). Daha sonra birçok araştırmacı, HSP'lerin prokaryotlar, mayalar ve bitkilerden ökaryotlara kadar bütün organizmalarda bulunan bir protein ailesi olduğunu belirlemiştir (107). Rat embriyo hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, hücre içi moleküller olarak bulunan HSP'lerin hücre dışı kompartmana da salındığı belirtilmiştir (108). HSP'lerin keşfinden sonra; iskemi, hipoksi, basınç artışı, ağır metaller, serbest oksijen radikalleri, protein kinaz C, etanol, aminoasit ve glukoz analogları, inflamasyon, sodyum arsenit, sitokinler ve enfeksiyonu içeren stresin yoğun olduğu durumlarda HSP artışının indüklenebileceği gözlenmiştir. HSP ekspresyonunun artışı, büyüme, gelişme ve farklılaşma gibi normal fizyolojik durumlarda da uyarılabilir (109,110)

2.3.2 Isı Şok Protein Ailesi ve Fonksiyonları

Isı şok proteinleri genel olarak molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılır. Her bir HSP'nin bir çok özelleşmiş fonksiyonu vardır ve hücre içinde çeşitli lokalizasyonlarda bulunurlar (109). Tipik olarak HSP 78, 75, 60 ve 10 organellerde bulunur. HSP 110, 90, 73,72 ve 20, nükleus ve sitozolde mevcuttur. HSP70 ise sitoplazma, peroksizom ve nükleusta bulunur. Hücresel seviyede HSP'ler endoplazmik retikulum, mitokondri, sitozol ve nükleusta günlük streslere cevap olarak düşük seviyelerde bulunur (107,110). Isı şok proteinleri moleküler şaperonlardır ve proteinlerin katlanma, toplanma, zar translokasyonu ve yıkım aşamasında rol alırlar. HSP'ler doğru katlanmanın metabolik yolunu kolaylaştırarak veya katlanmanın oluştuğu ortamı sağlayarak etki gösterir. Bu fonksiyonları hücrenin normal metabolizması, büyüme ve gelişmesi için gereklidir. Moleküler şaperonlar, sitozoldeki ve organellerdeki yeni çevrilmiş polipeptidlerin katlanmasına aracılık eder ve aynı zamanda agregasyonu engellemek için proteinleri stabilize eder. Proteinlerin doğru katlanması, stres tarafından meydana getirilen protein denatürasyonu ve agregasyonuna karşı bir savunma olarak görev alan, moleküler şaperonlardan oluşan ve daha önceden var olan bir protein

mekanizmasına bağlıdır. Isı şok protein genlerinin düzenlenmesine ısı şok faktör (HSF) aracılık etmektedir. Omurgalılarda HSF1 ısı şok protein genlerinin düzenlenmesinde etkilidir. Isı şokunun HSF1'i nasıl aktiflediği tam olarak açıklanamamıştır. Protein hasarları ve anormalliklerinin bu aktivasyona sebep olduğu düşünülmektedir. HSF, hem stres altında olan hem de olmayan hücrelerde bulunmaktadır ve stres altında olmayan hücrelerde inaktif formda olup, stres durumlarında HSF'nin aktif forma dönüşmesi gerekmektedir (111). Aktif HSF'nin ısı şok genlerinin önünde yer alan ısı şok elementleri (HSE) olarak adlandırılan üç veya beş baz çiftinden oluşan promotor bölgelere bağlanması sonucu ısı şok protein indüksiyonu meydana gelir. Major ısı şok protein genleri intronlar içermediğinden, strese maruz kaldığı andan itibaren çok kısa süre içerisinde mRNA hemen yeni proteine çevrilmektedir. Stres durumunda toplam HSF miktarı değişmez, fakat HSF'nin inaktif formundan aktif forma geçişi ve ısı şok protein ekspresyonu artar (115).

HSP70: İnsan hücreleri, yapısal ve fonksiyonel özellikleri ortak, stres uyarılabilirlikleri farklı çeşitli HSP70 ailesi üyelerini içerir. HSP70 ailesi; stresle oldukça indüklenebilir olan HSP70, temel olarak eksprese olan heat shock cognate proteini HSC70, mitokondrial glukoz ile regüle olan protein GRP75 ve GRP78/binding immünoglobulin protein (BİP)'i içerir (109,110)

HSP70 yapısında 3 major fonksiyonel bölge vardır (112):

1) N-terminal ATPaz bölgesi: Yaklaşık 45 kDa ağırlığındadır. ATP 'yi bağlar ve ADP'ye hidroliz olur. Bu hidroliz diğer iki bölgedeki konformasyonel değişikliklere neden olur.

2) Substrat bağlayan bölgesi: Nötral, hidrofilik aminoasit kalıntılarını içerir. 15 kDa ağırlığındadır. Yedi peptid kalıntısıyla etkileşime girebilecek uzunluktadır.

3) C-terminal bölgesi: Helikal yapıdan zengindir ve substrat bağlayan domain için kapak vazifesi görür. 10 kDa ağırlığındadır.

HSP70'deki tekrarlayan katlanmamış polipeptidlerin bağlanması ve serbest bırakılması siklusu, HSP40 ailesi üyeleri gibi çeşitli şaperonlar tarafından modüle edilir (109). HSP70 ailesinin hücredeki görevleri; proteinlerin hücre içinde transportuna yardımcı olur, hücre içinde sentez edilen proteinlerin katlamasında görev alır, kararsız proteinlerin yıkımında

rol oynar, protein komplekslerinin çözünmesine yardımcı olur, protein agregasyonunun engellenmesinde rol alır, bozuk katlanmış proteinlerin yeniden katlanmasına ve apoptozise yardımcı olur (113).

HSP90: HSP90 hücredeki bütün proteinlerin % 1-2'sini oluşturan önemli bir şaperon moleküldür (125). Sitoplazma ve endoplazmik retikulumda bulunur. Endoplazmik retikulumda en çok bulunan ısı şok proteinidir. İnsanlarda, sitoplazma içinde HSP90- α ve HSP90- β olmak üzere iki formu bulunur. HSP90- α (indüklenebilir/ana formu) ve HSP90- β (yapısal/küçük formu) olarak adlandırılır. HSP90 moleküler yapı bakımından 3 önemli bölgeden oluşur; 1) ATP bağlayan NH₂-terminal bölge (24-28 kDa), 2) İstemci protein bağlayan orta bölge (38-44 kDa), 3) Dimerizasyondan sorumlu -COOH terminal bölgesi (11-15 kDa) (125). HSP90 gibi proteinler ligand yokluğunda hormon reseptör bağlayıcı etki gösterirler. Bu moleküller steroid reseptörlerine bağlanarak, steroid hormonlar bağlanıncaya kadar steroid reseptörlerin nükleer DNA'ya bağlanmasını engellerler. Böylece steroid reseptörler ile DNA arasında zamanından önce oluşacak bir etkileşim önlenmiş olur (119).

HSP27: HSP27 küçük ısı şok proteinleri ailesinde yer alır. Isı şok proteini Beta-1 olarak bilinir. Oldukça iyi korunmuş C terminal kolunda 80-100 aminoasitten oluşan α -crystallin bölgesi yer alır. Stabil dimerlerin oluşmasından sorumludur. Daha az korunmuş N terminal bölgesi ise hareket ve esnekliğin sağlanmasından sorumludur. Hücrede sitozolde özellikle perinükleer alanlarda bulunur. Hücre farklılaşması ve gelişiminin çeşitli evrelerinde sentezinin arttığı gösterilmiştir (134).

HSP47: Kollajene spesifik moleküler şaperon olarak bilinir. Kollajen biyosentezi sırasında çeşitli basamaklarda düzenleyici şaperon olarak görev yapar. Kollajen bağlayan protein, Colligin, Romatoid Artrit ilişkili gen RAA47 gibi alternatif isimleri vardır. SERPINH1 ailesindedir. Endoplazmik retikulum lümeninde yer alır. SERPINH1 gen defekti sonucunda Osteogenezis İmperfekta tip 10'un meydana geldiği gösterilmiştir (134).

2.3.3 Şaperon Fonksiyonu

Şaperon; proteinlerin katlanarak üç boyutlu konformasyonunun oluşmasına yardımcı proteinlerdir. Şaperonların temel mekanizması; polipeptidlerin doğal olmayan konformasyonlarını tanıma ve translokasyon sırasında veya stres tarafından tetiklenen hasarı

takiben açıkta kalan hidrofobik rezidüleri bağlayarak agregasyondan koruma yetenekleridir. HSP70 proteinleri, sentezlenen polipeptidlerin katlanmasına yardım ederek, organel membranları arasında protein translokasyonuna rehberlik ederek, stabil olmayan veya anormal proteinlerin proteolitik indirgenmesini kolaylaştırarak ve regülatuar proteinlerin biyolojik aktivitelerinin kontrolünü sağlayarak, ATP bağımlı moleküler şaperonlar olarak görev yaparlar (116). HSP70'in protein katlanma süreci ATP ve ADP fazı olmak üzere iki fazda gerçekleşir. ATP fazında HSP70 proteinine bağlı olan ATP, ısı şok protein molekülündeki C terminal bölgesini etkileyerek substrat bağlayıcı bölgenin açık kalmasını sağlar. Ancak ATP bu bölgenin substrata karşı olan ilgisini azaltmaktadır (117). HSP40 proteinleri bu bölgeye substratların bağlanmasını sağlar. Aynı zamanda HSP40 proteinleri HSP70 de ATPaz'ı aktivite eder, moleküle bağlı olan ATP'nin ADP'ye dönüşmesini sağlar, ADP molekülü de ısı şok protein molekülündeki C terminal bölgesini etkileyerek substrat bağlayıcı bölgenin kapalı kalmasını sağlar (118).

2.3.4 Protein İndirgenmesi

Stres sırasında hasarlı katlanan proteinlerin yıkılması gerekir. Bu yıkım, protein indirgenmesinin esas yolu olan ubiquitin-proteazom aracılıklı proteoliz ile gerçekleştirilir. Ubiquitin-proteazom yolu, özgül inhibitörler ile bloke edilebilir. Bu durum anormal ve hasarlı proteinlerin birikmesine yol açar. Isı şok proteinleri ve diğer moleküler şaperonlar ile ısı şok yanıtını aktive eder. Protein birikimi ve agregat formasyonu; kistik fibrozis, alzheimer ve parkinson hastalığı, prion bozuklukları ve poliglutamin hastalıkları (örn: Huntington hastalığı) gibi birikim ile seyreden nörodejeneratif bazı hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Poliglutamin hastalığının fare modelinde, yüksek HSP70 seviyeleri nörodejenerasyona karşı koruyuculuk sağlamıştır ki, protein katlama mekanizmasının nöronal protein agregasyonunun regülasyonunda ve kontrolünde anahtar rolü olduğunu göstermektedir (120).

2.3.5 Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrolü

Granüllü ER, polipeptidlerin birleştirilmesi ve katlanmasında özelleşmiş bir organeldir. ER'de proteinlerin hatalı katlanması, akümüasyonu ve katlanmamış proteinlerin agregasyonu, ER yerleşik şaperonları kodlayan genlerin transkripsiyonunu selektif olarak aktifleyen bir sinyal oluşturur. Sonuç olarak, GRP78/BİP ve diğer şaperonlar anormal proteinlere bağlanırlar ve çözünürlüklerini sağlarlar. Bu kaskada katlanmamış protein cevabı

denilir. Sekretuvar yolun proteinlerinin birleştirilme ve modifikasyonu, ER’de gerçekleşir ve golgi cisimciğine aktarılmadan önce gereklidir. GRP 78’in hücreden protein transportunun izlenmesi esnasında anahtar bir görevi vardır. Eğer GRP78/BİP’in kendisi sekrete edilmez ve ER’de kalırsa, ona bağlı proteinlerde kalır. Kalite kontrolü, proteinler doğru bir şekilde katlanıp modifiye edilinceye kadar sekresyonun gecikmesi anlamına gelir. Böylelikle anormal proteinler hücreyi asla terk edemez veya yüzeyine ulaşamaz. Anormal proteinler, ER içinde Ubiquitin–proteazom yolu ile indirgeninceye kadar moleküler şaperonlar ile kompleks halinde tutulurlar (121).

2.3.6 Anti-apopitotik Etki

Stres cevabını ortaya çıkararak uyararak, stres sinyalinin süresi ve şiddetine bağlı olarak apopitozisi de başlatabilir. Apopitozis (veya programlanmış hücre ölümü) organizmada homeostazın devamlılığı için önemli bir hücrenel aktif kendi kendini yok etme biçimidir. Apopitoz, embriyonik gelişim sırasında ve hasarlı hücrelerin yok edilmesinde kritik rol üstlenir. Fonksiyon görememesi durumunda maligniteye dahi neden olabilir. Küçük HSP’ler, özelikle HSP 27, oksidatif stres altında sitokrom c salınımını inhibe ederek anti-apopitotik etki gösterir. İndüklenebilir HSP 70, apopitozu, sinyal kaskadına müdahale ederek ve efektör kaspazların aktivasyonunu bozarak engeller. HSP’lerin apopitozu engelleme fonksiyonları, çeşitli antikanser ilaçlar ve diğer ajanlar tarafından uyarılabilir. Bunun sonucunda kanser tedavisinin etkinliğini kısıtlayabilir (122).

2.3.7 Isı şok Proteinleri ve İmmünite

Isı şok protein ve onun gen ürünleri, organizmada iyi derecede korunmuş sistemlerden biridir. Bakteriyel HSP’ler sıçan ve insan immün yanıtlarının en potent uyarıcılarından biridir ve çeşitli adjuvanların esansiyel bileşenleridir. Yapılan alışmalar, HSP’lerin makrofajlar ve dentritik hücreler üzerinde Toll-like-reseptörler (TLR) ve diğer reseptörlerle etkileşime girdiğini göstermiştir. Günümüzde, HSP’lerin antijen sunan hücrelerde TLR’ler ve diğer reseptörler için ligand işlevi gördüğü anlaşılmıştır (123). Isı şok proteinlerinin esas işlevi, hücreyi çeşitli stres faktörlerinin etkisinden kurtarmaktır. Bu işlevini; hücre içerisinde DNA kırılmalarını önleyerek, proteinlerin taşınmasına aracılık ederek, serbest radikalleri ortadan kaldırıarak yerine getirir. Bazen bu işlevleri esnasında, HSP’ler hücre yüzeyinde eksprese

olur. Yüzeyde eksprese edilmeye başlanan HSP'ler, şiddetli bir immün cevabın başlamasına sebebiyet verir. HSP'lerin lipitlere bağlanma kabiliyeti vardır. Hücrenin stres nedeniyle hasar görmesi, hücre içi pH'ının değişmesi gibi durumlarda, zar lipitlerine bağlanabilirliğinin arttığı ve bu şekilde hücrenin yüzeyine taşınabildikleri belirtilmiştir (123). HSP sentezi, özellikle kanser gibi pek çok patolojik hadiselerle de ilişkilidir. Günümüzde HSP'lerin malign hastalıkların tedavisinde bir ajan olarak kullanılabilmesi ifade edilmiştir. HSP'ler malign hücrelerin yüzeyinde belirdiğinde, tümörle ilgili aktivasyonda rol alabilir. Böylelikle HSP'ler doğal killer hücrelerinin yanıtını aktive eder. Ya da antijen sunan moleküller olarak HSP-peptid kompleksinde (HSP-PC), ilgili peptidler aracılığıyla T hücrelerince özgül bir immün cevabın oluşmasına neden olur. Son zamanlarda HSP'lerin; selektif kemokinler ve onların reseptörlerini, sitokinleri, akut faz proteinlerini, Natural Killer hücre reseptör ve moleküllerini, Toll sinyal yolaklarının akış yönünün değişmesini indükleyerek doğal immün sistemin 'tehlike sinyalleri' olduğu anlaşılmıştır (107). HSP'ler, antijen tanınmasında ve antijen sunan hücrelerin aktive edilmesinde görev alırlar. HSP'ler proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırır. HSP70 virüs, bakteri ve tümör peptidlerine bağlanarak; HSP60 ise makrofajları ve dendritik hücreleri uyararak onları daha immünojenik hale getirmekte ve böylelikle immün sistem hücreleri tarafından daha iyi tanınmasını sağlamaktadır. Her iki ısı şok proteini TNF-alfa, IL-6 ve nitrik oksit ürünleri gibi inflamasyon mediatörlerinin sentezini indükler. İmmün sistem, sağlıklı bir biyolojik fonksiyon için nihai yeri, kinetikleri ve cevabın şiddetini kararlaştırmak zorundadır. Bu nedenle, inflamasyonda gerekli olan ısı şok proteinleri vücudun dengeli inflamatuvar cevabında anahtar bileşenlerdir. İnfeksiyonlar sırasında ısı şok proteinleri, aşırı eksprese olur ve salınır, mikrobiyal ürünlere bağlanır ve proinflamatuvar etkinliklerini artırır. Sonrasında daha çok ısı şok proteini salınır, tüm bunlar inflamasyonun paternini güçlendirir (123, 124).

2.3.8 Hücresel Stres Cevabı

Stresin tetiklediği, HSP ekspresyon artışı ile ilgili ilk fizyolojik fonksiyonlardan biri, kazanılmış termotoleranstır. Kazanılmış termotolerans; hücre veya organizmanın ısı stresinden sonra, öldürücü ısı maruziyeti öncesinde direnç geliştirme yeteneği olarak tanımlanır. Kazanılmış termotolerans geçicidir ve başlangıçtaki ısı stresinin şiddetine bağlıdır. Genel olarak başlangıçtaki ısının şiddeti fazlaysa termotolerans ve süresi de o kadar fazladır. HSP miktarının artması ile hücresel termotolerans arasındaki ilişki tam olarak

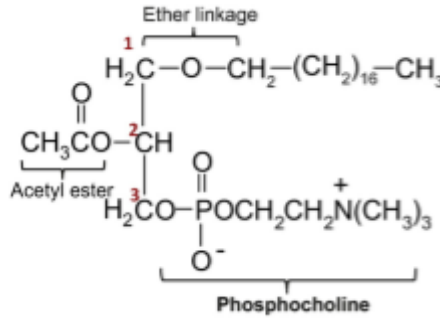
aydınlatılmamıştır (109). Hücrelerin 42°C'lik öldürücü olmayan ilk ısıya tabi tutulduktan sonra, öldürücü ısı olan 46°C'ye de kolay uyum geliştirdikleri gözlemlenmiştir. İlk ısı şokuna maruz bırakılan hücrelerin, normal protein sentezini durdurduğu, farklı bazı proteinlerin sentezine başladıkları gözlenmiştir. Bu proteinlerin sadece ısı şokuna değil; hücreye yönelik stres yaratan çeşitli faktörlere karşı da cevap olarak sentezlerinin artması, 'stres proteinleri' olarak isimlendirmelerine neden olmuştur (107).

2.4 Fibronektin

Fibronektin molekül ağırlığı 440 KiloDalton olan dimerik bir glikoproteindir. Epitel, deri, endotel gibi örtücü dokularda kollajen ve kendisi gibi kollajen olmayan laminin, elastin gibi yapıtaşlarıyla birlikte, hücreler arasında ve hücrelerle bazal lamina arasında bağlantı sağlanması gibi görevleri vardır (167). Fibronektin hücre göçü ve farklılaşması, hemostaz, pıhtı stabilizasyonu ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik bazı olaylarda da rol oynar. Ayrıca fibronektin, opsonin ve kemotaktik ajan olarak inflamasyonda da rol alabilir. En iyi bilinen opsoninler immunoglobulin G (IgG) ve komplemanın C3b bileşeni iken son yıllarda bunlara glikoprotein yapısında ve adeziv özelliği olan fibronektin de eklenmiştir (167). Fibronektin organizmada, çözünebilir ve bağlı formlarda bulunur. Çözünebilir fibronektin plazma, beyin omurilik sıvısı, eklem sıvısı, tükürük, servikal mukus ve inflamatuvar eksudada bulunur. Bağlı fibronektin ise örtücü dokuların bazal membranları, hücre yüzeyi ve bağ dokusunun bir bileşenidir. Bir çok hücrede üretilmesine rağmen ana üretim yeri hepatositlerdir. Sentezlenen bu fibronektin solübl (eriyik) formu oluşturmaktadır. Fibronektinin diğer formu olan sellüler fibronektin; fibroblast, epitelyal hücreler ve makrofajlar tarafından üretilmektedir. Fibronektin adezyon, migrasyon, farklılaşma ve proliferasyon gibi hücre sel hadiselerde rol oynayan bir glikoproteindir. Hücreler arası sinyal iletimini de kontrol etmektedir. Fibronektin embriyogenezin pek çok basamağıyla ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca apoptozisi baskıladığı, hemopeotik öncül hücre maturasyonu ve diferansiyasyonunu etkilediği, inflamatuvar hücrelerin adezyonunu düzenlediği, bazı vakalarda makrofajlarla olan fagositozu potansiyalize ettiği ve yara iyileşmesinde rol aldığı bilinmektedir. Fibronektinin kronik inflamasyon, infeksiyon, yara iyileşmesi, malignensi, metastaz, koagülasyon ve trombozu içeren çeşitli olaylarda rol oynadığı belirtilmektedir (172).

2.5 Platelet-Aktive Edici Faktör (PAF)

PAF 1-alkil 2-asetil-sn-glisero 3-fosfokolin yapısında ilk defa 1970'li yıllarda keşfedilmiş bir gliserofosfolipittir. IgE ile stimülasyonu bazofillerden salınmasının ardından trombosit agregasyonuna yol açtığı görülmesiyle platelet aktive edici faktör (PAF) olarak isimlendirilmiştir. Eter bağı gliserofosfolipitler arasında yer alır. Yapısındaki gliserolün sn-1(C-1) pozisyonunda eter bağı uzun alkil zincir, sn-2 (C-2) pozisyonunda ise ester bağı asetil kalıntısı vardır. Polar alkol grubu kolindir. Etkilerini oldukça spesifik G protein bağı transmembran proteini aracılığıyla gerçekleştirir. Reseptörü PAFR olarak adlandırılır. İki farklı sentez yolu vardır: Yeniden modellenme ve de novo sentez. Yeniden modellenme membran yapısında bulunan lipitlerin uzun zincirli yağ asiti kalıntılarının yerini sn-2 pozisyonunda asetil kalıntısı almasıyla gerçekleşir. PAF asetil hidrolaz ile enzimatik yıkıma uğrar (144).



Şekil-9: Platelet-Aktive Edici Faktör Yapısı

2.6 Seruloplazmin

Seruloplazmin total serum bakırının %95'ini bağlayan α -2 globulin ailesine ait bir plazma proteindir. Seruloplazminin fizyolojik görevi plazmanın redoks tepkimeleriyle ilişkilidir. Serbest ferrik iyonları ve ferritin bağlayan bölgelerin varlığı gibi faktörlere bağı olarak oksidan ve antioksidan işlevleri vardır. Seruloplazmin demirin iyonik durumunun düzenlenmesinde ve toksik demir ürünleri oluşmadan demirin transfer edilmesinde hayati önemi vardır (105). Serüloplazmin mavi, çoklu bakır oksidaz enzimleri olarak adlandırılan protein ailesindedir. 1046 aminoasitten oluşur, 132 kDA ağırlığındadır. Vücuttaki bakırın %95'inin taşınmasından görevlidir. Seruloplazmin demirin uzaklaştırılmasında önemli rol

oyun. Cp disfonksiyonu, özelde ferooksidaz aktivitesinin azalması, demirin bir çok dokuda, vasküler hücrelerde ve lökositlerde birikimine neden olur. Seruloplazminin Glikozilfosfatidilinozitol bağlı formu memelilerin santral sinir sisteminde sentezlenir. Seruloplazmin geni defektif farelerde serebellum ve beyin sapı gibi bölgelerde demir birikimi olduğu gözlenmiştir (177).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada, hasta grubu 2011-2012 yılları arasında Tokat Devlet Hastanesi'ne başvuran ve KKKA tanısı alan 44 vakadan oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise herhangi bir metabolik ve infeksiyon hastalığı olmayan, sigara içmeyen, yaş ve cinsiyet açısından hasta grubuyla benzer aynı sayıdaki sağlıklı erişkin gönüllülerden oluşturuldu. KKKA olduğu düşünülen hastaların tanıları, KKKA referans laboratuvarında (Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü) serolojik testler ELISA (IgM) ve/veya PCR testleri tarafından doğrulanmıştır.

3.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

1. ELISA Okuyucu (BIO-TEK[®] ELx 800)
2. Plate Yıkayıcı (das[®])
3. İnkübatör (redLine by BINDER[®])
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)
11. Distile su cihazı (Nüve[®])
12. Cam malzemeler (Mezür, Beher)

13. Jelsiz Boş Biyokimya Tüpü (Hema&Tube®)

14. Biyokimya Otoanalizörü (Abbott C8000 Illionis, USA)

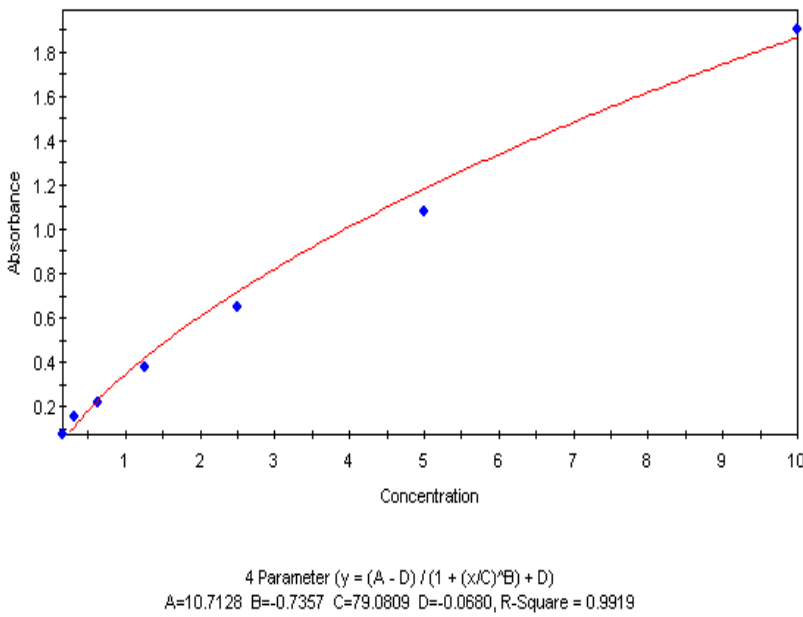
3.3 Serum HSP, PAF ve Fibronektin Düzeylerinin Belirlenmesi

Ticari amaçla üretilmiş HSP70 (lot.no:BMS2087,eBioscience), HSP90- α (lot.no:BMS2090, eBioscience), HSP 47 (lot.no:ab202407,abcam) hsp 27 (lot. no: BMS2086, eBioscience), PAF (lot.no:Csb-E07929h,Cusabio), fibronektin (lot.no: BMS2028, eBioscience) kitleri kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü. Numuneler depolanmış olduğu buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına getirildi. Kullanılan reaktifler ve solüsyonlar üreticinin tavsiyesi doğrultusunda hazırlandı.

HSP70 Ölçümü: HSP70 standardının eksternal dilüsyonla hazırlanması: Her bir standart noktası için tüpler 1'den 7'ye kadar numaralandırıldı. (S1,S2,S3,S4,S5,S6,S7). Sonrasında standart eğrinin oluşturulması için iki kat seri dilüsyon yapıldı: Her bir tüpe 225 μ l Sample Dilüent eklendi. S1 olarak numaralandırılan birinci tüpe 225 μ l Konsantre standart (kons: 20 ng/ml) eklendi, düzgünce karıştırıldı. (S1 kons: 10 ng/ml) Bu dilüsyondan 225 μ l S2 tüpüne pipetlendi, güzelce karıştırıldı. Seri dilüsyon işlemi 5 kez daha tekrarlandı. Standartlar oluşturuldu. Son durumda (S1: 10 ng/ml, S2: 5ng/ml, S3: 2.50 ng/ml, S4: 1.25 ng/ml, S5: 0.625 ng/ml, S6: 0.313 ng/ml, S7: 0.156 ng/ml)

Test protokolü: Mikroplaka 2 kez Yıkama Solüsyonu ile yıkandı. (Yıkamalar arasında aspirasyondan önce 15 sn. beklendi). Eksternal Standart dilüsyonla hazırlanan S1,S2,S3,S4,S5,S6,S7 standartlarından 100 μ l A'dan G'ye kadar her bir kuyucuğa eklendi. H kuyucuğu kör olarak boş bırakıldı. Kör kuyucuğuna 100 μ l Sample Dilüent eklendi. Numune kuyucuklarına 50 μ l Sample Dilüent eklendi. Her bir numune kuyucuğuna 50 μ l numune eklendi. Mikroplaka yapışkan film ile kaplandı. Oda sıcaklığında, mikroplaka çalkalayıcı üzerinde 400 rpm'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Biotin-Konjugat hazırlandı. Yapışkan film çıkarıldı. Kuyucuklar boşaltıldı. Yıkama protokolüne göre 6 kez yıkandı. Bütün kuyucuklara 100 μ l Biotin-Konjugat eklendi. Yapışkan film ile kaplanan mikroplaka, oda sıcaklığında 400 rpm'de mikroplaka çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Streptavidin-HRP hazırlandı. Yapışkan film çıkarıldı. Kuyucuklar boşaltıldı. Yıkama protokolüne göre 6 kez yıkandı. Kör dahil olmak üzere bütün kuyucuklara 100 μ l Streptavidin-HRP eklendi.

Yapışkan film ile kaplanan mikrolaka, oda sıcaklığında 400 rpm'de mikrolaka çalkalayıcı üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yapışkan film çıkarıldı. Kuyucuklar boşaltıldı. Yıkama protokolüne göre 6 kez yıkandı. Bütün kuyucuklara TMB-Substrat Solüsyonu eklendi. Karanlık ortamda mikrolaka 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 100 µl Stop Solüsyonu hızlı bir şekilde eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikrolaka okuyucuda her bir kuyucuğun verdiği absorbans 450 nm'de ölçüldü. Sonuçlar kaydedildi. Her bir standart konsantrasyonunun ortalama absorbansının işaretlenmesiyle standart eğri oluşturuldu. Standart eğri grafiğine göre her bir absorbansın karşılık geldiği konsantrasyonlar bulundu. Dilüsyon faktörü ile çarpılarak sonuçlar hesaplandı.



Şekil-10: HSP70 Standart Eğrisi

3.4 Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü

Erel tarafından geliştirilmiş tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Numunede bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H₂O₂ kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ equivalent/L olarak ifade edilir (126).

3.5 Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan seviyesini ölçen bir metottur. Fe^{2+} -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile fenton tipi reaksiyon oluşturarak $OH\cdot$ radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikalleri oluşur. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon tepkimelerine katılarak renk oluşumunu artırmaktadır. Fakat numunelerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadır. Bu tepkime otoanalizörde 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünen bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilir (127).

3.6 Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması

Numunelerin oksidatif stres indekslerini (OSİ) hesaplamak için öncelikle TOS ve TAS'ın birimleri μmol şeklinde hesaplandı. Daha sonra, $OSİ(AU)=[(TOS \mu\text{mol/L})/(TAS \mu\text{mol/L})] \times 100$ formülüne göre OSİ hesaplandı.

3.7 Seruloplazmin (Ferrooksidaz) Düzeyi Ölçümü

Seruloplazminin ferrooksidaz enzim aktivitesi Erel metoduna göre ölçüldü (4). Bu metod ferröz demir iyonunun ferrik demir iyonuna oksidasyonunu içermektedir. Sonuçlar U/L olarak ifade edilir.

3.8 Yapılan 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. İstatiksel anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Tablo-3: KKKA ve Kontrol Gruplarındaki Parametrelerin Karşılaştırılması

	KKKA (n=44)	KONTROL (n=44)	<i>p</i>
HSP 90, ng/mL	120.04 ± 36.70	10.09 ± 3.20	<0.001
HSP 70, ng/mL	4.92 ± 1.49	0.48 ± 0.15	<0.001
TAS, mmol trolox Eq./L	1.04 ± 0.22	1.09 ± 0.13	0.203
TOS, µmol H₂O₂ Eq./L	56.76 ± 12.83	14.08 ± 2.74	<0.001
OSİ, Arbitrary Units	5.76 ± 2.12	1.28 ± 0.20	<0.001
HSP 47, ng/mL	3,77 ± 0,96	3,61 ± 1,28	0.524
HSP 27, pg/mL	1178,05 ± 344,58	286,92 ± 95,64	<0.001
Seruloplazmin,U/L	768,39 ± 192,29	579,92 ± 141,70	<0.001
Fibronektin, µg/mL	66,20 ± 18,62	159,32 ± 29,29	<0.001
PAF, ng/mL	36,42 ± 11,32	8,77 ± 2,86	<0.001

Mean ± Standart Deviation

Tablo 3' te görüldüğü gibi Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) grubundaki HSP70, HSP 90, HSP27, TOS ve OSİ düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

KKKA grubunun TAS düzeyi ise kontrol grubuna göre düşük olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). HSP47 düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur fakat gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Seruloplazmin aktivitesi KKKA grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$)

Hasta grubundaki fibronektin düzeyleri kontrol grubundan daha düşük bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlıdır. PAF düzeyleri hasta grubunda daha yüksektir ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

Tablo-4: Isı Şok Proteinleri ve Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki Korelasyon Tablosu

		HSP90	HSP27	HSP47	TAS	TOS	OSİ
HSP70	<i>r</i>	,869	,850	,145	-,054	,823	,718
	<i>p</i>	,000	,000	,178	,627	,000	,000
HSP90	<i>r</i>		,875	,107	-,092	,882	,784
	<i>p</i>		,000	,320	,403	,000	,000
HSP27	<i>r</i>			,046	,004	,790	,649
	<i>p</i>			,674	,972	,000	,000
HSP47	<i>r</i>				-,245	,123	,155
	<i>p</i>				,024	,265	,160
TAS	<i>r</i>					-,179	-,472
	<i>p</i>					,103	,000
TOS	<i>r</i>						,930
	<i>p</i>						,000

r: korelasyon katsayısı

p: istatistiksel önem

Parametreler arasındaki korelasyon analizi incelendiğinde HSP70 ile HSP90, TOS, OSİ arasında pozitif bir ilişki (sırasıyla $r:0.869, p<0.001$; $r:0.823, p<0.001$; $r:0.718, p<0.001$) mevcut olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4'te de görüleceği gibi; HSP90 düzeyinin TOS ve OSİ ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (sırasıyla $r:0.882, p<0.001$; $r:0.784, p<0.001$). TAS düzeyleri ile HSP 70 ve HSP 90 arasında herhangi bir korelatif ilişki bulunmamıştır (sırasıyla $r:-0.054, p=0.627$; $r:-0,092, p=0.403$).

HSP70 ve HSP27 ile OSİ arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki bulunmuştur (sırasıyla $r:0.718, p<0.001$; $r:0.649, p<0.001$)

HSP47 ile TAS, TOS ve OSİ arasında herhangi bir korelatif ilişki bulunmamıştır (sırasıyla r :-0.245, p =0.24; r :0.123, p =0.265; r :0.155, p =0.160).

Tablo-5: Isı Şok Proteinleri ile İnflamatuvar Belirteç Parametreleri Arasındaki Korelasyon Tablosu

		HSP90	HSP27	HSP47	Cp	Fibronektin	PAF
HSP70	r	,869	,850	,145	,486	-,795	,780
	p	,000	,000	,178	,000	,000	,000
HSP90	r		,875	,107	,443	-,841	,849
	p		,000	,320	,000	,000	,000
HSP27	r			,046	,432	-,833	,777
	p			,674	,000	,000	,000
HSP47	r				,078	-,033	,058
	p				,476	,763	,592
Seruloplazmin	r					-,431	,433
	p					,000	,000
Fibronektin	r						-,782
	p						,000

r : korelasyon katsayısı

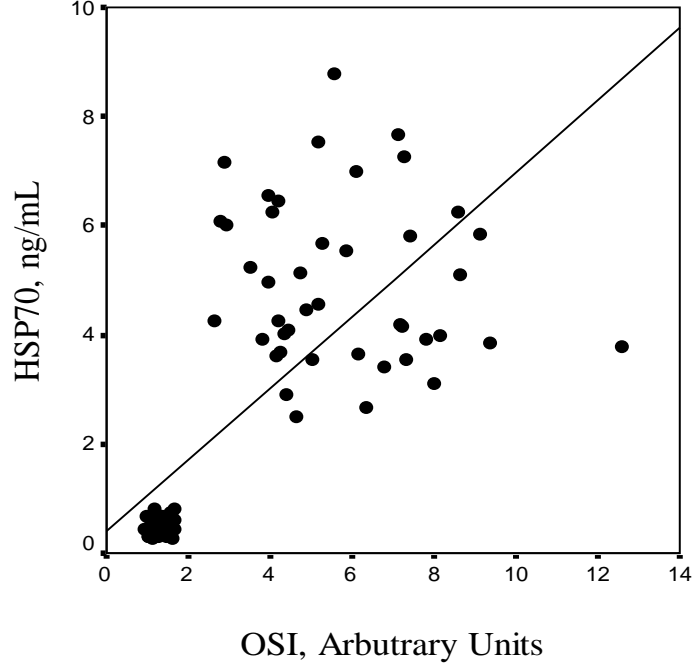
p : istatistiksel önem

Tablo-5'te görüldüğü gibi HSP27 ve HSP70 ile Seruloplazmin arasında pozitif yönde orta derecede bir ilişki mevcut olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla r : 0,432 p <0.01; r :0.486, p <0.01).

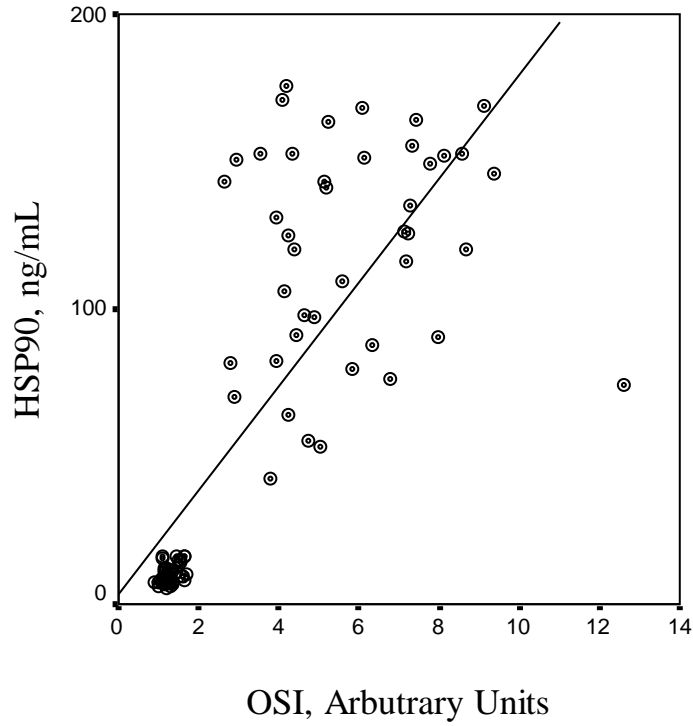
Fibronektin ile PAF arasında negatif yönde anlamlı güçlü bir ilişki bulunmuştur (r : -0.782, p <0.01).

HSP90 ve HSP27 ile Fibronektin arasında negatif yönde güçlü bir ilişki bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır. (Sırasıyla r :-0.841, p <0.01 ; r -0,833, p <0.01).

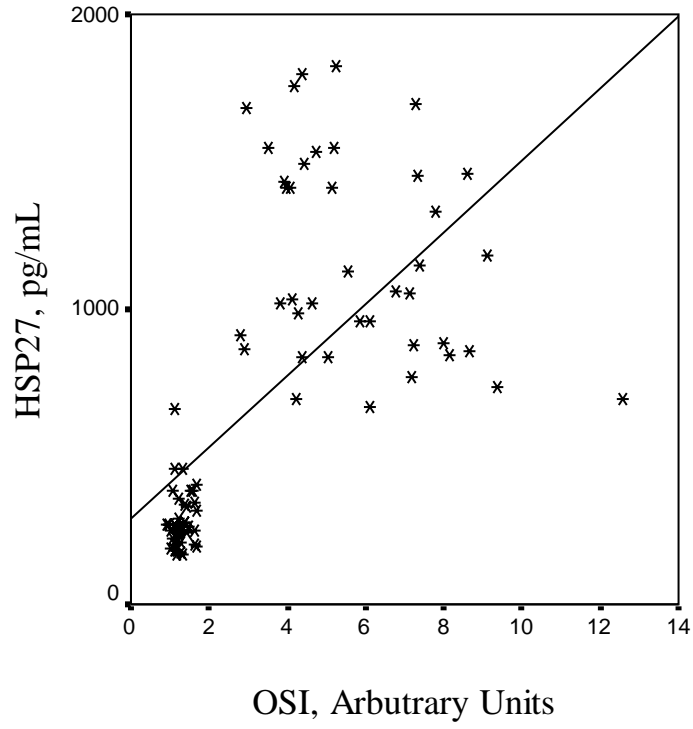
HSP70 ve HSP90 ile PAF arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki vardır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Sırasıyla $r: 0.849, p<0.01$; $r: 0.780, p<0.01$).



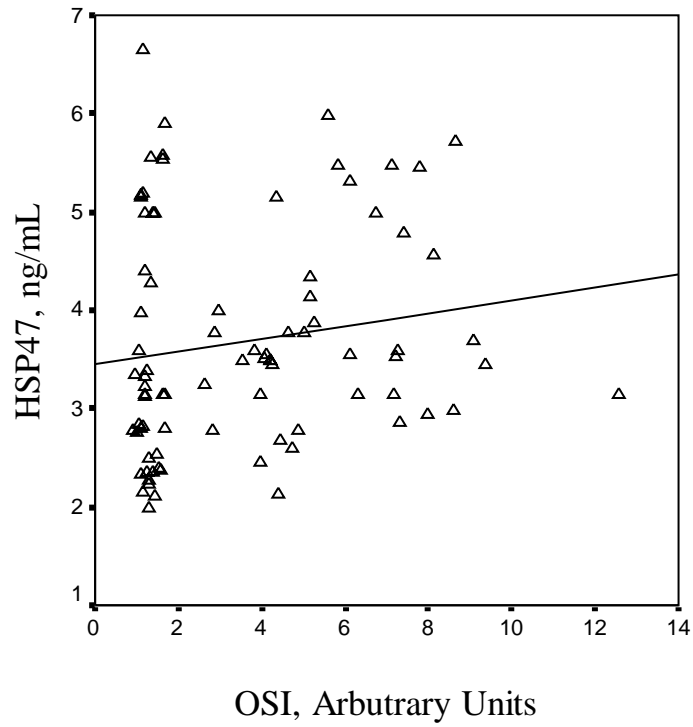
Şekil-11: HSP70 ile OSI arasındaki pearson korelasyon analizi ($r:0.718, p<0.001$)



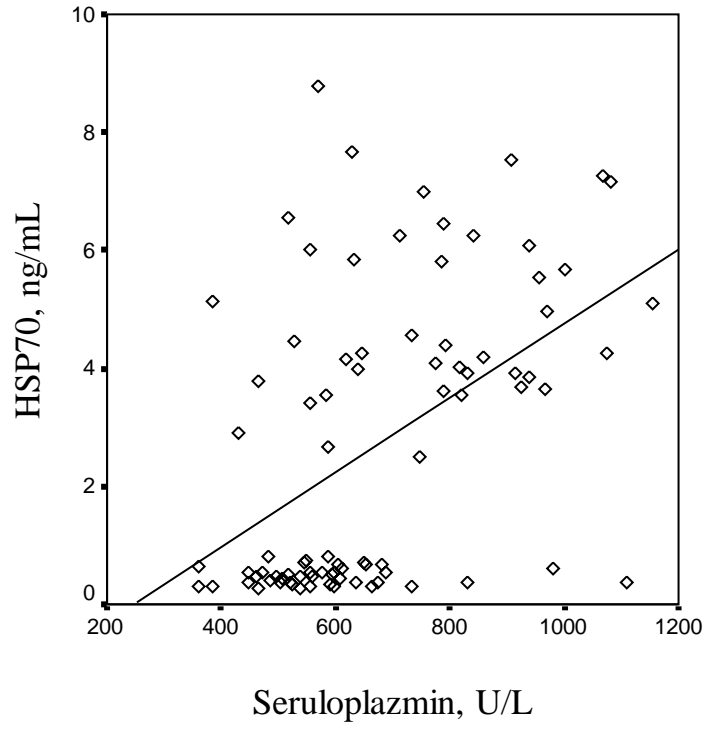
Şekil-12: HSP90 ile OSI arasındaki pearson korelasyon analizi ($r:0.784, p<0.001$)



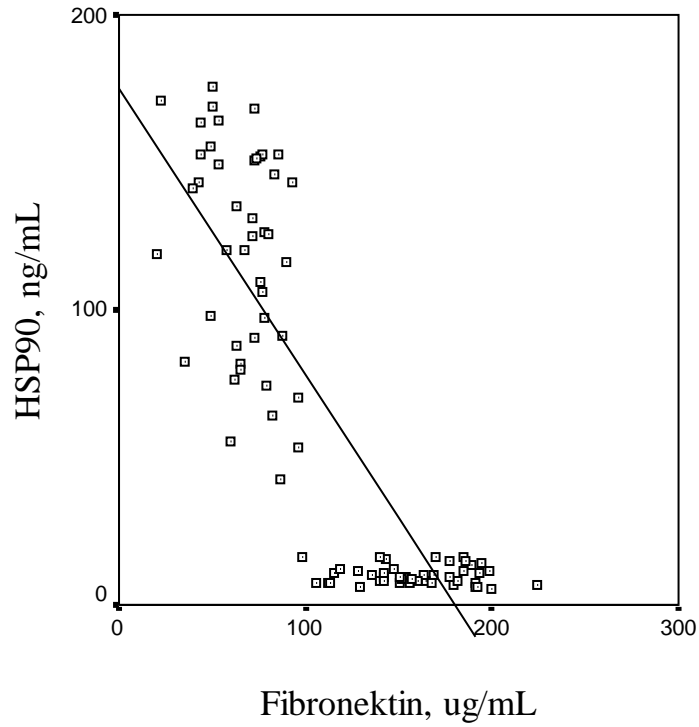
Şekil-13: HSP27 ile OSI arasındaki pearson korelasyon analizi ($r:0.649$, $p<0.001$)



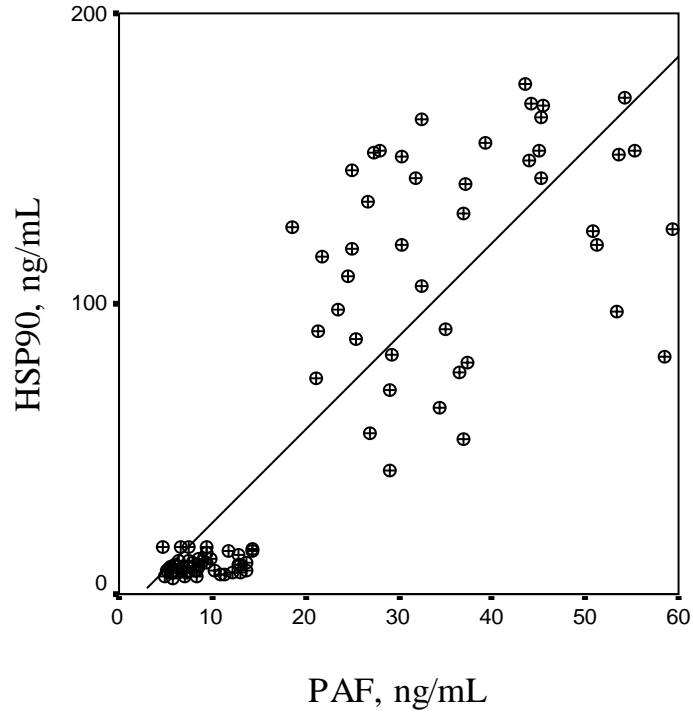
Şekil 14: HSP47 ile OSI arasındaki pearson korelasyon analizi ($r:0.155$, $p=0.160$)



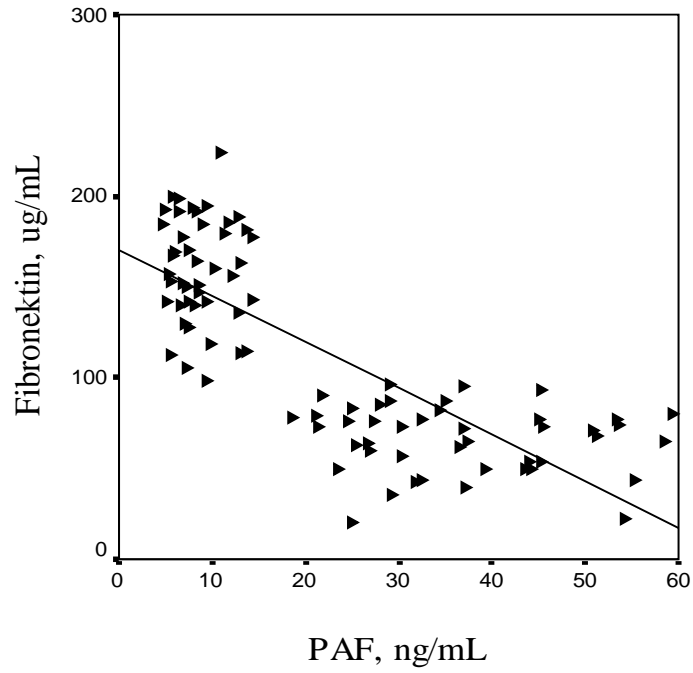
Şekil-15: HSP70 ile Seruloplazmin arasındaki pearson korelasyon analizi ($r:0.486, p<0.001$)



Şekil-16: HSP90 ile Fibronektin arasındaki pearson korelasyon analizi ($r:-0,841, p <0.001$)



Şekil-17: HSP90 ile PAF arasındaki pearson korelasyon analizi ($r:0,849$, $p<0.001$)



Şekil-18: Fibronectin ile PAF arasındaki pearson korelasyon analizi ($r:-0,782$, $p<0.001$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

KKKA Bunyaviridae ailesinden Nairovirus türü içinde yer alan KKKAV'nün neden olduğu, yüksek mortalite ile seyreden önemli bir hastalıktır. Tıbbi olarak önemli kene kaynaklı hastalıklardan en geniş coğrafik dağılıma sahip olanıdır. Hastalık genellikle şiddetli baş ağrısı, miyalji, ateş, bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal, ekimoz ve kanama gibi akut bulgularla kendini gösterir. Yüksek serum transaminaz değerleri, trombositopeni ve lökopeni hastalığın belirgin laboratuvar bulgularıdır. Erken konulan tanı ve başlanan tedavi ölüm oranını azalttığı ve enfeksiyonun ikincil olarak yayılımını önlediği için kanamalı hastalığın ilk ortaya çıkan özelliklerinin bilinmesi önemlidir (41). KKKKA günümüze kadar Asya, Afrika ve Avrupa kıtalarında gözlenmiştir. Hastalık bugüne kadar aralarında ülkemizin de olduğu 30'dan fazla ülkede tanımlanmıştır. Ülkemizde ilk olgu 2002 yılında rapor edilmiştir. Vakaların büyük bir çoğunluğu İç Anadolu Bölgesinin kuzeydoğusu ile Karadeniz Bölgesinin iç taraflarında, özellikle Tokat, Sivas, Bayburt, Gümüşhane ve Erzurum illerinde gözlenmektedir. 2004-2014 yılları arasında ülkemizde toplam 8919 vaka görülmüş olup, bu vakalardan 434'ü ölümlle sonuçlanmıştır (168). Son yıllarda KKKKA'nın patogenezi ile ilgili çalışmaların artmaya başladığı görülsede bu konudaki veriler yetersizdir (32,53). Viral kanamalı ateşlerin patogenezi benzerlik gösterir (17). Patogenezin anlaşılması, tedavinin planlanması için önem taşımaktadır. Viral kanamalı ateş etkenleri arasında, her bir etkenin patofizyolojisi farklılık gösterse de, patogenezi endotel hasarı ve hemostazın bozulması gibi temel ortak özellikler ön plandadır. KKKKA'da, diğer tüm VKA'larda olduğu gibi trombositopeni görülür. Ölümle sonuçlanan vakalarda, hastalığın erken döneminden itibaren ciddi trombositopeni vardır (7). Ayrıca, endotel hasarı da trombosit yıkımını artırarak trombositopeniye katkıda bulunabilir (39). Genel olarak, VKA'lerde ölümün kanamaya bağlı olarak gerçekleştiği zannedilse de, ölümden septik şok ve çoklu organ yetmezliği sorumludur (17,18). Virüs, vücuda girdikten sonra, bölgesel lenf bezlerinde, deride ve deri altı dokuda çoğalır. İnkübasyon periyodunu takiben akut hastalık periyoduna benzeyen kısa bir viremi dönemi ve ateş meydana gelir. Daha sonra lenf dolaşımı ve monositler yoluyla başta dalak, karaciğer, akciğer, adrenal bezler ve endotel olmak üzere vücuda yayılır. Ana hedefin mononükleer hücreler, hepatositler ve endotel olduğu bilinmektedir. Viral yayılım sonucu doku ve organlarda başta mononükleer hücreler ve nötrofillerin ağırlıklı olduğu enflamasyona yol açar (1). Makrofaj ve endotel hücrelerinin aktive olmasıyla sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) gelişebilir (1). KKKKA patogenezi en önemli basamak endotelin

etkilenmesidir. Virüsün endotel içerisinde çoğaldığı primer olarak endoteli hedef aldığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra doğrudan virüsün etkisinden ziyade virüse karşı salınan aşırı miktarda inflamatuvar sitokinlerin 'sitokin fırtınası' denilen bir duruma yol açtığı, sitokin fırtınasının neden olduğu sitokin-aracılı endotel hasarının hastalığın patogenezinde temel mekanizma olduğu anlaşılmıştır (1,129). Endoteldeki hasar intrensek koagülasyon kaskadını aktive eder, trombosit adhezyon ve agregasyonunu artırır. Sonuçta yaygın damar içi pıhtılaşma, vasküler geçirgenlik artışı, perfüzyon bozukluğu ve çoklu organ yetmezlik sendromu (ÇOYS) ortaya çıkar (1). Yaygın damar içi pıhtılaşma, KKKA'da pıhtılaşma faktörlerinin plazmada aşırı tüketimi sonucu görülen bir durumdur (38). Ayrıca hastalıkta plazma koagülasyon faktörlerinin sentezi azalır, çünkü bu faktörlerin sentez yeri olan karaciğerin fonksiyonları da viral sitopatik etkiyle bozulmaktadır (36,38). Ölen hastaların karaciğer hücrelerinde çeşitli derecelerde nekroz, yağlanma ve portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonu gösterilmiştir. Mononükleer hücre infiltrasyonu hepatosellüler hasarın yoğun olduğu alanlarda değil, daha çok hasarın az olduğu alanlarda saptanmıştır. İnfekte ve hasarlı hepatositlerde anlamlı bir inflamatuvar cevabın olmayışı, hasarın virüsün direkt sitopatik etkisiyle oluştuğunu göstermektedir (35). Tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi immün cevap ve özellikle antikor sentezi enfeksiyonun sınırlandırılmasında ve iyileşme sürecinde önemlidir. Nitekim KKKA'da ağır hastalarda bozulmuş bağışık yanıt söz konusudur (38). Fatal seyreden KKKA vakalarında antikor yanıtının yetersiz olduğu bildirilmekte olup bu vakalarda, inflamatuvar mediatörler muhtemelen önemli rol oynamakta ve bu hastalarda şok ile birlikte fulminan seyir gözlenmektedir (35). KKKA nedeniyle ölen hastalarda IL-6, IL-10, IL-12 ve TNF- α gibi sitokin düzeyleri araştırılmış ve yaşayan hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (130). KKKA'nın hastalarda sepsis tablosuna neden olması, inflamatuvar sitokinlerin patogenezinde önemli rol oynaması, hem oksidatif stresin hem de ısı şok proteinlerinin sepsis ve inflamatuvar sitokinlerle kuvvetli ilişkisinin gösterilmiş olması, bize KKKA'da oksidatif stres ve ısı şok proteinlerinin ilişkisi açısından bir fikir vermektedir. Bu amaçla KKKA'da ısı şok proteinlerini ve oksidatif stres parametrelerini değerlendirdik. Aditif etkileşim göstermesi nedeniyle oksidan ve antioksidanların etkilerini tek tek incelemek yerine total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) değerlerini kullandık, oksidatif stres indeksini (OSI) hesapladık (127). Bilgilerimize göre KKKA'da ısı şok proteinleri ile ilgili literatürde bu zamana kadar yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca literatürde oksidatif stres ile ısı şok protein ilişkisini karşılaştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu yüzden ısı şok proteinlerini ve oksidatif stres parametrelerini KKKA'nın

patogenezinde önemli rol oynayan sepsis, trombositopeni gibi durumlarla da karşılaştırdık. Ayrıca patogenezinde vasküler endotel hasarın rol oynadığı preeklampsi gibi hastalıklarla karşılaştırdık.

Oksidatif stresin bir çok metabolik bozukluk ve enfeksiyon hastalığının patogenezine önemli katkıda bulunduğu bilinmektedir. Hepatit B ve Hepatit C virüsünün neden olduğu oksidatif stresin karaciğer patolojisinde önemli rolü olduğu belirtilmiştir (131). Vektör olarak virüsü taşıyan canlılarda dahi oksidatif stresin meydana geldiği gösterilmiştir. Dengue Virüsünü taşıyan sivrisineklerde yapılan bir çalışmada, oksidatif stresin arttığı, sivrisineklerin canlılığını sürdürebilmesinin antioksidan savunma sistemlerinin etkili çalışmasıyla mümkün olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca antioksidan maddelerin virüs titrelerini azaltmada etkili olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (132,133). Virüs konak hücreye reseptörler aracılığı ile bağlanır. İçeri alındıktan sonra sitoplazmik salınımı ve soyulma gerçekleşir. Viral poliproteinlerin sentezi ve işlenmesinin ardından RNA genomunun replikasyonu, paketlenme ve montajı gerçekleşir. Virüs yaşam döngüsünün bütün aşamaları şaperon aktivitesi ve virüs proteinlerinin şaperonlarla etkileşimini gerektirir (135). Virüs proteinleri; hücre metabolizmasında, kritik sinyal yollarında, organel morfolojisinde değişikliklere yol açar. Virüs proteinleri ayrıca enfeksiyonun devamlılığını sürdürebilmek için immün sistemden kaçmada görev alır. Viral replikasyon hücrede mitokondriyal homeostazisi bozar. Mitokondriyal homeostazisin bozulması düzensiz mitokondriyal morfolojinin oluşumuna, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi ve oksidatif stresin meydana gelmesiyle sonuçlanır. Oksidatif stresin oluşumu, strese karşı koymak için antioksidan programların aktivasyonuna yol açar, oksidatif stresle mücadele başarısız olduğu takdirde apoptozis tetiklenir.

Belirli bir hücredeki redoks durumu NF- κ B, AP1, p53 gibi bir çok transkripsiyon faktörü ve aktivatörünün aktivitesinin düzenlenmesinde hayati öneme sahiptir. Redoks durumu hücresel hedef gen ekspresyonunu etkiler ve çok sayıda hücresel sinyal yolağını modüle eder. Reaktif oksijen türlerinin seviyesinin dengede tutulması, hücrenin normal fizyolojik fonksiyonu için gereklidir (136).

Narayan ve arkadaşları, KKKAV ile aynı aileden Rift Vadisi Ateşi virüsüyle ilgili in vitro ortamda yaptıkları bir çalışmada, HSAEC hücrelerinde virüs enfeksiyonu sonrası erken dönemde SOD1'in azaldığını gözlemlemişler, SOD1'in down regülasyonunun artan TNF-alfa düzeyiyle korele gerçekleştiğini belirtmişlerdir. HSAEC hücrelerinde SOD1 down regülasyonunun şiddetli oksidatif stres koşullarında, HSP27'nin translokasyonu ve

fosforilasyonu p38 MAPK yolağının aktivasyonuna neden olduğunu, bunun hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için çok önemli bir basamak olduğunu belirtmişlerdir. Bu şekilde enfekte olmuş hücrelerin apoptozisin başlangıcını geciktiren koruyucu bir mekanizma geliştirdiğini belirtmişlerdir (138). Viral enfeksiyonun neden olduğu oksidatif stresin Hepatit B, Hepatit C, Dengue virüs, Rift Vadisi Ateşi gibi virüslerin patogeneze katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (137,138). Duygu ve arkadaşları Hepatit B enfeksiyonlu hastalarda oksidatif parametrelerin HBV DNA ve enfeksiyonun aktivasyonu ile ilişkisini değerlendirdikleri çalışmada, 93 Hepatit B yüzey antijeni negatif taşıyıcı, 65 kronik Hepatit B hastası ve 42 sağlıklı erişkini çalışmaya dahil etmişler; TAS, TOS, OSI, SH, katalaz, LOOH ve serülopazmin serum düzeylerini, HBV DNA titrelerini ve fibrozis derecesini değerlendirmişlerdir. ALT, TOS, OSI, LOOH düzeylerini kronik hepatit B grubunda diğer gruplara göre daha yüksek bulmuşlardır ($p<0.001$). TAS, katalaz ve seruloplazmin düzeylerini gruplar arasında farklı olarak bulmuşlar, düzeylerinin hastalığın artan şiddeti ile azaldığını belirtmişlerdir ($p<0.001$). Sülfidril kontrol grubunda diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kronik hepatit grubunda HBV DNA ile OSI arasında bir ilişki bulunmadığını belirtmişlerdir ($p>0.05$). Sonuç olarak oksidatif stresin Hepatit B aktivitesi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (3).

Soundravally ve arkadaşları Dengue Kanamalı Ateşi hastalarında oksidatif durum belirteçleriyle trombositopeninin ilişkisini araştırdıkları bir çalışmada, serum malondialdehit (MDA), total antioksidan seviye (TAS), protein karbonil düzeylerini ve trombosit sayımını değerlendirmişler. Hasta grubunda serum MDA ve protein karbonil düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlar, ayrıca hasta grubunda lipid peroksidasyon düzeyleriyle trombositopeninin derecesi arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir (139).

Aydın ve arkadaşları KKKA hastalarında TAS, TOS, OSI, LPO, PON ve aril esteraz düzeylerini inceledikleri bir çalışmada, KKKA hastalarında kontrol grubuna göre TOS, OSI ve LPO düzeylerini anlamlı derecede yüksek bulmuşlar, PON, TAS ve aril esteraz düzeylerini ise düşük bulmuşlardır. TAS düzeylerindeki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. Aydın ve arkadaşları yapmış oldukları bir başka çalışmada ise KKKA hastalarında serum SOD, GSH-Px, GR, CAT, vitamin E düzeyleri ile serum ve eritrosit MDA düzeylerini yaş ve cinsiyet açısından hasta grubuyla uyumlu kontrol grubuyla

karşılaştırmışlar, SOD enzim aktivitesini hastalarda kontrol grubuna göre düşük bulmuşlardır ($p<0.05$). CAT, GR, GSH-Px enzim aktivitelerinde KKKA hastalarında anlamlı bir değişiklik olmadığını gözlemlemişlerdir ($p>0.05$). Vitamin E düzeylerini hastalarda düşük bulmuşlar ($p<0.05$), Hem serum hem de eritrosit MDA düzeylerini KKKA hastalarında yüksek bulmuşlardır ($p<0.05$) (140,141).

KKKA'da trombositopeni hastalığın değişmez bulgusudur. Yapılan çalışmalarda trombositlerin immün sistem hücreleri olduğu, mikrobisidal etkisinin olduğu gösterilmiştir(142). Trombositlerin doğal bağışıklığın bir elemanı olarak kendi vasküler çevrelerinde tehlike sensörü olarak görev yaptığı belirtilmiştir. Mikrobiyal ajanın yayılımını sınırlamak için trombositlerin agregasyon sonucu trombüs formasyonu oluşturduğu, bunun lökositler tarafından konsolide edildiği belirtilmektedir. Bu durum enfeksiyon sırasında meydana gelen trombositopeniyi de açıklamaktadır. Böylece enfeksiyon sırasında trombositlerin kullanımıyla trombositopeni, aşırı koagülasyon, pıhtılaşma bozukluğu ve DİK gelişebilmektedir. Prokoagülan etkilerinin yanı sıra, trombosit içeriğindeki granüllerin ve aktif maddelerin anti-inflamatuvar özellik gösterdiği ve bunun reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katkı sağladığı belirtilmiştir (143). Güner ve arkadaşlarının KKKA hastalarında trombositopeni ile plazma total tiyol durumu arasındaki ilişkiyi araştırdıkları bir çalışmada, TOS düzeylerini hastalarda kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlar, total tiyol düzeylerini ise hastalarda kontrol grubundan daha düşük bulmuşlardır. TOS ve tiyol düzeyleri arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Ayrıca KKKA hastalarında total tiyol düzeyleriyle, trombosit sayısı arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir ($r = 0.84$, $p < 0.001$). Trombosit sitoplazmasındaki aktif maddelerin hücre yüzey sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek granül sekresyonu, adhezyon, integrin aracılı agregasyon gibi bir takım fonksiyonel cevapların bloke edilmesinde rol oynadığını belirtmişlerdir. Düşük trombosit sayısının ve trombosit fonksiyonlarındaki bozukluğun plazma total tiyol düzeylerindeki azalmadan sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir (145).

Literatürde bizim çalışmamızdan farklı olarak, Karadağ-Öncel ve arkadaşları KKKA'da plazma TAS, TOS, OSI ve total tiyol düzeylerini değerlendirdikleri çalışmada, 34 çocuk ve 41 erişkini çalışmaya dahil etmişler, yaş ve cinsiyet olarak benzer kontrol gruplarıyla karşılaştırmışlardır. Hasta ve kontrol gruplarının ortalama TAS değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ortalama TOS, OSI

ve total tiyol düzeyleri KKKA hastalarında kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca plazma total tiyol seviyeleri ile; trombosit sayısı arasında pozitif yönde bir korelasyon, kanama riski arasında negatif yönde bir korelasyon belirlemiştirlerdir. Plazma TTL düzeylerinin KKKA enfeksiyonuna karşı koruyucu rol üstlendiğini belirtmişlerdir (146).

Patojen mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesinde fagolizozom oluşumu önemli bir basamaktır. Lökosit içinde fagositik öldürme sırasında mikroorganizmaya toksik etkili reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. NADPH oksidaz, miyeloperoksidaz gibi oksidan enzimlerin oluşturduğu toksik ürünler organizmada oksidatif stresin kaynağı olabilir. Lökositlerin anti-mikrobiyal fonksiyonları fagositoz sürecinin bir parçası olarak meydana gelir. Solunum patlaması fagozom membranında lokalize NADPH oksidaz aracılığıyla gerçekleşir. Bu işlemde, oksijen tüketimi artar ve süperoksit radikalleri (süperoksit anyonlar ve hidrojen peroksit) hızlı bir şekilde meydana gelir. MPO, hidrojen peroksiti katalize eder ve hipohalöz formlar oluşur. Bunlar ise mikroorganizmalara olduğu kadar memeli hücrelerine de toksiktir(147). Güven ve arkadaşları KKKA'da miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktivitesinin önemini araştırdıkları bir çalışmada, lökosit ve plazma MPO düzeylerini ELISA yöntemiyle belirlemişler, KKKA hastalarında hem lökosit hem de plazma MPO aktivitelerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. Miyeloperoksidaz enzim aktivitesinin doğrudan fagositik lökositlerin aktivasyonu ile ilgili olduğunu, lökositlerde viral yüke bağlı olarak MPO enzim aktivitesinin artmasının lökositlerin yıkımına yol açtığını, KKKA hastalarında plazma MPO enzim aktivitesindeki yüksekliğin lökositlerin yıkımı nedeniyle gerçekleştiğini belirtmişlerdir (148).

Isı şok proteinleri yüksek derecede korunmuş hücre içi proteinlerdir. Hücre içi proteinlerin doğru katlanması, hasarlı proteinlerin yıkımı, sinyal iletimi, transkripsiyon faktörlerinin sentezi, steroid reseptörü, çeşitli stres uyanlarına karşı hücreyi koruma gibi görevleri bilinmektedir. Son yıllarda ısı şok proteinlerinin sadece hücre içinde değil, hücre dışında ve hücre membranında önemli görevleri olduğu gösterilmiştir. TLR4 gibi reseptörlerle, Apaf-1, NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleriyle ilişkisi ısı şok proteinlerini immün sistemde önemli görevleri olduğunu göstermiştir (149,150). Çeşitli transkripsiyon faktörlerinin, özellikle de NF- κ B'nin oksidatif stresle olan ilişkisi de bilinmektedir. Hem ısı şok proteinleri hem de oksidatif stres parametreleri transkripsiyon faktörleri üzerinden birbirleriyle etkileşimde bulunuyor olabilirler. Isı şok proteinleri hücre içerisinde stresle

indüklenen moleküler şaperonlardır. Isı şok proteinlerinin inflamatuvar ve anti-apoptotik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. İn vivo etkilerine ilave olarak ekstraselüler ısı şok proteinlerinin, hücre hasarına karşı korumada temel görevleri vardır. İntaselüler ısı şok proteinleri, bir çok stres uyarımına bağlı olarak ekstraselüler ortama salınırlar. Literatürde klinik olarak yapılan çalışmalarda serum ısı şok protein düzeylerinin diyabetik hastalarda, akut enfeksiyonda, iskemi-reperfüzyon hasarında, travmada ve sepsiste arttığı gösterilmiştir (151,179).

Isı şok proteinleri sadece hastalık durumlarında değil, vücudun hastalık dışında maruz kaldığı çeşitli stres durumlarında da yükselir. Heck ve arkadaşları aşırı egzersizin neden olduğu yorgunluğun lenfositlerden yüksek miktarda HSP70 salınımına yol açarak plazma ısı şok protein düzeylerinin yükseldiğini belirlemişlerdir (152). Egzersizin ısı şok proteinlerinin plazma düzeyini nasıl yükselttiğini araştıran Lollo ve arkadaşları, egzersiz sırasında sıcaklık artışı, hipoksi ve serbest radikal oluşumunun sistemik değişiklere yol açarak ısı şok protein artışına neden olduğunu belirtmişlerdir (153).

Ding ve arkadaşları insan periferik kan monosit kaynaklı makrofaj(MDM) hücrelerinde lipopolisakkaritle oluşturulmuş sepsis modelinde, LPS tarafından indüklenen sitokin (TNF- α ,IL-1 β ,IL-10,IL-12) üretiminin HSP70 over-ekspresyonuyla inhibe edildiğini göstermişler, HSP70'in LPS ile indüklenen sitokin üretiminin regülasyonunda görev aldığı ve enfeksiyon ya da diğer patolojik stresler sırasında sitokinlerin olumsuz etkilerini azaltıcı yönde etki gösterdiğini belirtmişlerdir (158).

Isı şok proteinleri yüksek derecede korunmuş sitoprotektif proteinlerdir. Ülseratif kolitli hastalarda HSP70 ve HSP90'ın inflamasyonun alevlenmesinde ve hastalığın prognozunun değerlendirilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Romatoid artritli hastalarda inflamasyonun derecesiyle korele yüksek ısı şok proteinleri rapor edilmiştir. Bakteriyel ya da protozoal patojenler tarafından oluşturulan çeşitli enfeksiyon hastalıklarında ısı şok proteinlerinin yüksekliği bildirilmiştir (155,156,170). Ayrıca febril aralıktaki ateşin HSP70 ekspresyonunun stimülasyonuna, ekstraselüler salınımında artışa yol açtığı belirtilmiştir (157).

İnfeksiyon durumunda ısı şok proteinlerinin arttığı, ısı şok proteinlerinin artan serum düzeyleriyle çeşitli inflamasyon markırları arasında pozitif yönde korelasyon olduğu gösterilmiştir. Nijemini ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada akut infeksiyon sırasında artan serum HSP70 düzeylerinin direkt olarak inflamatuvar durumla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Serum HSP70 düzeylerindeki önemli artışın, artan inflamasyonun derecesiyle korele olarak gerçekleştiğini belirtmişlerdir (159).

Bruce ve arkadaşları ısı şok proteinleriyle antioksidan savunma sistemini değerlendirdikleri bir çalışmada, tip 2 diyabetli hastalardaki insülin rezistansının HSP70 ekspresyonundaki azalmayla ilişkili olduğunu, bunun antioksidan savunma mekanizmasındaki defektten kaynaklandığını belirtmişlerdir (160). Choi ve arkadaşları HSP70.1 geni inaktive edilen k/o farelerde yapmış oldukları çalışmalarda ısı şok proteinlerinin hücreleri oksidatif stresten koruduğunu belirtmişlerdir. HSP70 'in iskemi-reperfüzyon hasarında nöroprotektif etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. HSP70 ile süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri çalışmada, k/o farelerdeki SOD aktivitelerini vahşi tip yavrulara göre anlamlı ölçüde daha düşük bulmuşlardır. HSP70'in süperoksit dismutaz ekspresyonunun regülasyonunda transkripsiyonel ya da posttranskripsiyonel modifikasyon basamamada etkili olabileceğini belirtmişlerdir (171).

Afolayan ve arkadaşları deneysel olarak persistan pulmoner hipertansiyon oluşturdukları fetal kuzu akciğerinden elde ettikleri pulmoner arteriyel endotel hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada, indüklenebilir HSP70'nin süperoksit dismutaz ve mitokondriyal oksidatif stresin regülasyonunda rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada normalde sitozolde sentezlenen süperoksit dismutazın, oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan süperoksit anyonlarını azaltmak için mitokondriye geçtiği, bu geçişte HSP70'in görev aldığını belirtmişler, pulmoner hipertansiyonda endotel hücrelerinde bu geçişin bozulduğunu ifade etmişlerdir. Koimmünpresipitasyon çalışmalarında HSP70 ve SOD'un aynı lokalizasyonlarda bulunduğunu tespit etmişlerdir. HSP70'in SOD'un mitokondriye translokasyonunda şaperon fonksiyon gördüğünü ve bunun mitokondriyal oksidatif stresin regülasyonunda kritik basamak olduğunu belirtmişlerdir. Persistan pulmoner hipertansiyonda mitokondriyal solunum ve ATP sentezinin bozulmasıyla HSP70-SOD ayrışmasının azaldığı, bunun sonucunda SOD'un mitokondriye geçişinde azalma ve süperoksit anyonunun artmasıyla karakterize oksidatif stresin meydana geldiğini belirtmişlerdir (161).

Hunter-Lavin ve arkadaşları tip 2 diyabetli hastalarda yükselen serum ısı şok protein düzeylerinin, antioksidan bir vitamin olan folik asit takviyesiyle anlamlı ölçüde azaldığını gözlemlemişler, bunun tip 2 diyabet hastalarındaki oksidatif strese bir iyileşme sonucunda meydana geldiğini belirtmişlerdir. Hunter-Lavin ve arkadaşları periferik kan mononükleer hücrelerinin proinflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin yanı sıra HSP70 salınımının da kaynağı olduğunu belirtmişlerdir (162). Yuan ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada HSP70'in mitokondri ilişkili apoptotik yolu inhibe ederek intestinal epitel hücrelerini hipoksi/reoksijenizasyon hasarından koruduğunu belirtmişlerdir. Yuan ve arkadaşları bu çalışmada hipoksi ve ardından reoksijenizasyona maruz bıraktıkları intestinal epitel hücrelerinde Western Blot ve immunofloresans analizlerle Bcl-2, HSP70, ve sitokrom C ekspresyonunu incelemişler, HSP70 over-ekspresyonunun hasarın neden olduğu mitokondri membran potansiyelindeki azalmayı, sitokrom C salınımındaki artışı geri döndürdüğünü belirtmişlerdir. HSP70 over-ekspresyonunun Bcl-2 ekspresyonundaki artış ile korele olduğunu göstermişlerdir (163).

Gelain ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada serum ısı şok proteinleri, oksidatif durum ve mortalite ilişkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada sepsis teşhisinden sonra en geç 12 saat içinde serum HSP70, TRAP, TBARS ve karbonil düzeylerini belirlemek için numuneleri aldıkları hastaları 28 gün boyunca ya da ölüncüye kadar takip etmişlerdir. Sepsisli hastaların HSP70 düzeylerinde anlamlı artış gözlemlemişlerdir. Serumda oksidatif parametrelerin analizine göre, oksidatif hasar geliştiği tespit edilen sepsisli hastaların yüksek serum HSP70 düzeylerine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra kontrol grubuna göre oksidatif stres parametrelerinde farklılık gözlenmeyen sepsisli hastalarda normal serum HSP70 düzeyleri rapor edilmiştir. Sepsis ağırlık derecesi ve yaşam süresi verilerine göre; serum HSP70 düzeylerinin hastaların oksidatif durumu tarafından modüle edildiğini ve artan serum HSP70 düzeylerinin sepsisli hastalarda artan mortaliteyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (164).

HSP'lerin çeşitli inflamasyon durumlarında tedavi edici ajan olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Tsai ve arkadaşları ratlarda deneysel olarak oluşturulmuş sepsis modelinde, dışarıdan verilen HSP70'in ratlarda sepsisin indüklediği karaciğer fonksiyon bozukluğunu geri döndürdüğünü belirtmişlerdir (154). Bunun yanı sıra çeşitli virüslerin hücreye girişini ve replikasyonunu tamamlamak için ısı şok proteinlerini konağa

sentezlettirdiği yönünde çalışmalar vardır. Ayrıca geldanamisin ve quercetin gibi HSP inhibitörlerinin virüs replikasyonunu inhibe ettiğini belirten çalışmalar mevcuttur (181,184).

Dengue virüsünün monosit/makrofajlara girişinde HSP70 ve HSP90 nın nasıl görev aldığını değerlendirmek için sağlıklı gönüllülerden izole edilen 14 günlük monosit/makrofaj hücreleri (Dengue virüsü ya da diğer flavivirüsler açısından negatif), anti-HSP70 ve anti-HSP90 monoklonal antikorlarıyla tedavi etmişler, daha sonra Dengue virüsüyle enfekte etmişlerdir. 48 saatlik inkübasyonun ardından monoklonal antikorlarla tedavi edilen monosit/makrofajlarda enfekte virüs titresinde önemli azalma kaydetmişlerdir. Yapmış oldukları infeksiyon inhibisyon testlerinde HSP70 ve HSP90'ın Dengue virüsünün monosit/makrofajlara girişinde gerekli reseptör kompleksinin bir komponenti olarak değerlendirmişlerdir(165).

IL-6'nın KKA'da hastalığın patogenezi ve progresyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. IL-6 immün sistemde, hematopoezde, akut faz reaksiyonunda önemli görevlere sahip çok yönlü bir sitokindir. Spesifik HSP90 inhibitörü Geldanamisin'in IL-6'nın indüklediği STAT3 gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiş, HSP90 overekspresyonuyla STAT3 üzerindeki inhibisyonun kalktığı da belirtilmiştir (178).

Novoselova ve arkadaşları endotoksin enjekte ederek akut ve kronik toksik stres oluşturdukları farelerde yapmış oldukları çalışmada sitokin üretimi ve ısı şok protein düzeylerini değerlendirmişler, endotoksin enjeksiyonunun HSP70 ve HSP90 ekspresyonunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. Akut stresin TNF- α , TNF- β ve NO üretiminde güçlü bir artışa neden olduğunu, bu artışın ısı şok protein düzeylerindeki artışla korele olarak gerçekleştiğini belirtmişlerdir. 11 gün boyunca artan endotoksin maruziyeti sonucunda oluşan kronik strese, başlangıçtaki akut strese göre daha az HSP70 ve HSP90 artışı belirtilmiş, bunun tekrarlayan endotoksin enjeksiyonunun vücudun strese karşı cevap yeteneğinde azalma sonucunda meydana geldiğini belirtmişlerdir (180). Antioksidan maddelerle tedavinin IL-6, TNF-alfa gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretiminde ve apoptotik hücre ölümünde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. HSP inhibitörü Quercetin'in Hepatit C virüs replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda HSP70 knockdownunun virüs replikasyonunu azalttığı gözlenmiştir. HSP90 inhibitörü Quercetin'in viral replikonlarda ve hümanize karaciğerli farelerde HCV replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Yine HepG2.2.15 hücrelerinde

yapmış oldukları çalışmada HSP90 inhibitörlerinin HBV replikasyonunu engellediği, HSP90'ın HBV tedavisinde majör bir hedef olabileceğini belirtmişlerdir (181,182,183).

Molvarec ve arkadaşları preklamptik hastalarda yapmış oldukları bir çalışmada artmış serum ısı şok protein düzeylerinin preeklampside sistemik inflamasyonu, oksidatif stres ve karaciğer hasarını yansıttığını belirtmişlerdir. Molvarec ve arkadaşları bu çalışmada sistemik inflamasyon markırı (CRP), endotel aktivasyon markırı (vWF), endotel hasar markırı (fibronektin) oksidatif stres markırı (Malondialdehit) ve karaciğer fonksiyon testlerini değerlendirmeye almışlardır. HSP70 serum düzeylerini preklamptik gebelerde, normotansif sağlıklı gebelere göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Artan serum HSP70 düzeylerinin; serum CRP düzeyleri, AST ve LDH aktiviteleri ve plazma MDA (malondialdehit) düzeyleriyle yüksek derecede korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir (186).

Fisher ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada vitamin E suplementasyonunun insanlarda iskelet kasında ve dolaşımda egzersizin indüklediği HSP70 artışını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada Fisher ve arkadaşları aşırı egzersiz sırasında iskelet kasından kaynaklı reaktif oksijen türlerinin oluştuğunu ve bunun ısı şok cevabını indükleyerek HSP70 düzeyini artırdığını belirtmişlerdir. Fisher ve arkadaşları çalışmaya dahil ettikleri 21 genç erkeği 3 farklı gruba bölmüşler, 28 günlük vitamin takviyesinin ardından ağır egzersiz sonrası serum askorbik asit, α -tokoferol, γ -tokoferol, HSP70, lipid peroksidasyon markırı olarak 8-iso-prostaglandin-F2 α (8-PGF2 α) düzeylerini ölçmüşler, egzersiz sonrası her üç grupta da 8-PGF2 α düzeylerini anlamlı derecede yüksek bulmuşlar, α -tokoferol ile γ -tokoferolün birlikte takviye yapıldığı grupta, diğer gruplara göre HSP70 düzeylerini anlamlı derecede daha düşük bulmuşlardır (169).

Marini ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada in vitro ortamda insan periferik lenfositlerinde serbest radikallerin ısı şok proteinlerini indüklediğini ve oksidatif strese karşı tolerans sağladığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada artan dozlarda hidrojen perokside (H₂O₂) maruz bırakılan lenfositlerde, HSP70 ve HSP90 ekspresyonlarının anlamlı şekilde arttığını gözlemlemişlerdir. Daha yüksek dozda serbest radikallerle karşılaşmadan önce uygulanan orta derece hiperterminin (42°C'de 1 saat) ya da düşük doz oksidatif stresin, stres proteinleri tarafından ortaya konan koruyucu rol ile uyumlu koşullarda lenfositlerin ömrünü uzattığını belirtmişlerdir (166).

Fibronectin enfeksiyona karşı inflamatuvar cevabın her aşamasında fagositlerle etkileşim halindedir. Kollajen artıklarının, hasarlı trombositlerin ve nekrotik dokuların uzaklaştırılması sırasında retikuloendotelial sistem ile bağ kurar. Vasküler bütünlüğün sağlanması, yara iyileşmesi ve koagülasyon kaskadının tetiklenmesinde rol oynar. Kompleman sisteminin bakterisidal kapasitesinin stimülasyonunu sağlayan modülatör olarak görev alır. Ruiz Martin ve arkadaşları plazma fibronectinin sepsis tanı belirteci olabileceğini belirttikleri çalışmada, 4 farklı grupta fibronectin düzeylerini değerlendirmişlerdir. Birinci grup kültür pozitif sepsis kriterlerini sağlayan hastalardan, ikinci grupta kültür pozitif, yüksek ateşe sahip fakat sepsis kriterlerini karşılamayan hastalardan, üçüncü grup enfeksiyon hastalığı bulunmayan hastaneye başvurmuş hastalardan ve dördüncü grup ise sağlıklı kontrol grubundan oluşturulmuştur. Fibronectin düzeylerini gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulmuşlar, enfeksiyonun belirti ve şiddeti arttıkça fibronectin düzeylerinde anlamlı azalma olduğunu belirtmişlerdir (172).

Bhatia ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DİK tablosu gelişen hastalarda, fibronectin seviyelerini düşük bulmuşlardır, bunu da opsonizasyon sürecinde ve mikrovasküler bütünlüğün sağlanması sırasında tüketilmesine bağlamışlardır. DİK gelişmeyen preeklampitik hastalarda fibronectin seviyesini yüksek bulmuşlardır, bunu da yaygın endotel hasarına bağlamışlardır (173). Kandemir ve arkadaşları sağlıklı ve kronik hepatitli bireylerde serum fibronectin düzeylerini ve AST, ALT gibi karaciğer enzim seviyelerini incelemişlerdir. Kronik viral hepatitli olgularda serum fibronectin düzeylerinin sağlıklı bireylere oranla düşük; AST, ALT gibi karaciğer enzim seviyelerinin yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Serum fibronectin düzeyleri ile AST, ALT düzeyleri arasında negatif bir korelasyon belirlemişler, fakat bu korelasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulmamışlardır (174).

PAF bilinen en güçlü inflamatuvar ajanlardan biridir. Sepsis ve çeşitli enfeksiyonlarda yüksekliği bildirilmiştir (144). İnflamasyonun yanı sıra alerji, vasküler geçirgenlik artışı, koagülasyon kaskadının tetiklenmesi gibi durumlarda önemli rol oynar. Jeewandara ve arkadaşları Deng Ateşi hastalarında sepsis ve vasküler geçirgenliğin göstergesi olarak PAF düzeylerini değerlendirdikleri bir çalışmada, hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre serum PAF düzeylerini anlamlı yüksek bulmuşlardır. Deng ateşli hastaların serumlarını insan umbilikal ven endotel hücrelerine (HUVEC) uygulamışlar, HUVEC hücrelerinde vasküler

bütünlüğün ve sağlamlığın göstergesi olarak sıkı bağlantı proteini-1 (ZO-1) ekspresyonunu ve transendotelial rezistansı (TEER) değerlendirmişlerdir. ZO-1 ekspresyonunun ve TEER'in azaldığını gözlemlemişler, hücrelere serum eklenmesinden önce PAFR blokörü uygulandığında ise ZO-1 ekspresyonunun ve TEER'in normale döndüğünü belirtmişlerdir. Akut deng infeksiyonunda PAF'in vasküler sızıntıda önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (185).

Serüloplazmin ferooksidaz aktivitesine sahip bir akut faz proteindir. Ferooksidaz aktivitesi enfeksiyon ve oksidatif durum arasındaki ilişkiyi göstermesi bakımından önemlidir. Özgüneş ve arkadaşları romatoit artritli hastalarda serüloplazmin aktivitesini ve MDA düzeylerini değerlendirmişler, çalışmaya 33 romatoit artrit hastasını 34 kontrol hastasını dahil etmişlerdir. Hem Cp aktivitesini hem de MDA düzeylerini romatoit artritli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulmuşlar, Cp ve MDA arasında önemli bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir ($r=0.58$, $p<0.05$, $n=33$). RA gibi inflamatuvar durumlarda lökositlerin etkilenen bölgeye geçerek reaktif oksijen türlerini üretmek için 'aktive' olduklarını belirtmişlerdir. Yüksek MDA düzeylerine sahip olan hastalarda yüksek Cp aktivitesinin görüldüğünü, artan MDA düzeylerinin Cp aktivitesinde artışla ilişkisi olduğunu, serüloplazminin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin olabileceğini belirtmişlerdir (176). Denko ve arkadaşları deneysel olarak oluşturulmuş inflamasyon modelinde dışarıdan Cp enjeksiyonunun inflamasyonda azalmayla sonuçlandığını, Cp'nin oksijen kaynaklı serbest radikallerin inflamasyonu artırıcı etkisini önlediğini belirtmişlerdir (177).

Yapmış olduğumuz çalışmada TOS ve OSI değerlerini KKA hastalarında kontrol grubuna göre daha yüksek bulduk ($p<0.001$). TAS değerleri KKA hastalarında kontrol grubundan daha düşük olmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Oksidatif stres indeksi (OSI) ile HSP70 ve HSP90, HSP27 serum düzeyleri arasında önemli derecede ilişki vardı (Sırasıyla $r:0.718$, $p<0.001$; $r:0.784$, $p<0.001$; $r:0.649$, $p<0.001$). Bu verilerin ışığında KKA'nın neden olduğu viral enfeksiyonun KKA hastalarında oksidatif stres oluşturduğunu söyleyebiliriz. Hastalarda oksidan/antioksidan dengesizliği sonucunda redoks imbalansı gelişmiş olabilir. Bu dengesizlik antioksidanların azalmasından ziyade, reaktif oksijen türlerinin aşırı oluşumundan kaynaklanıyor olabilir.

Isı şok proteinleri hücrenin hasara uğradığı durumlarda anti-apoptotik özellikler gösterir. Böylece hasarlı hücrenin apoptoza gitmesi engellenerek, hücre tamir için zaman

kazanır. Hücrede hasarın tamir edilmeyecek derecede olması gibi durumlarda membrana transloke olarak ya da hücre dışına salınarak 'tehlike sinyali' görevi görür ve immün sistem hücrelerini uyarır. Ayrıca ısı şok proteinlerinin pasif olarak nekrotik hücrelerden de salındığı bilinmektedir. Aşırı hasar sonucu yıkılan trombosit ve lökositler ısı şok proteinlerinin kaynağı olabilir. Ayrıca virüsün direkt sitopatik etkisiyle ya da primer olarak enfekte ettiği ve nekroza yol açtığı hepatositler ve endotel hücreleri bu proteinlerin kaynağı olabilir. Serum HSP27, HSP70 ve HSP90 düzeylerinin hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p < 0.001$), HSP47'nin yüksek ama anlamlı olmaması ($p > 0.05$), kollajen spesifik moleküler şaperon olan HSP47'nin inflamasyonda diğer ısı şok proteinleri kadar rol oynamadığının göstergesi olabilir.

Seruloplazmin ferooksidaz aktivitesi bir inflamasyon belirteci olarak hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Isı şok proteinleriyle, özellikle HSP70 ile orta derecede korelasyon göstermiştir ($r: 0.486$, $p < 0.001$). PAF düzeyleri hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. PAF'ın platelet kümelenmesiyle trombositopeni ve DİK'e, vasküler geçirgenlik artışıyla hipotansiyon ve şoka katkıda bulunması nedeniyle PAF inhibitörleri kanamalı ateş tedavisinde kullanılabilir. Fibronektin düzeyleri ise PAF ile yüksek derecede negatif korelasyon göstermiş, hastalarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Solübl formdaki fibronektinin başlıca sentez yerinin karaciğer olduğu bilinmektedir. Fibronektin, KKKAV'nün primer hedeflerinden karaciğerde yol açtığı hasar sonucu, karaciğerin fibronektin sentez fonksiyonunda bozulmaya bağlı olarak azalmış olabilir. Ayrıca fibronektinin kemotaktik ajan olarak virüse karşı savunmada kullanımı bu azalmaya katkıda bulunmuş olabilir. Fibronektin negatif akut faz reaktanı olarak değerlendirilebilir.

Biz bu çalışmada KKKKA tanısı almış hastaları değerlendirdik, hasta grubunda hastalığın şiddeti ile ilgili bir ayrıma gitmedik. Isı şok proteinleri ve oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin ve bu ilişkinin hastalığın patogeneze katkısını daha iyi anlamak için hastaların maruz kaldığı viral yüke ve hastalığın ağırlık derecesine göre sınıflandırıldığı geniş hasta gruplarında kapsamlı çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Ergönül Ö. Viral Kanamalı Ateşler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 3.Baskı Nobel Tıp Kitabevleri 2008; 1: 1251-65.
2. Andersson I. Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus: interferon-induced antiviral mechanisms and immune evasion strategies. From Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet and the Swedish Institute for Infectious Disease Control, Stockholm, Sweden. 2008.
3. Duygu F, Karsen H, Aksoy N, Taskin A. Relationship of oxidative stress in hepatitis B infection activity with HBV-DNA and fibrosis. *Annals of laboratory medicine*, 2012;32(2):113-8.
4. Erel O. Automated measurement of serum ferroxidase activity. *Clin Chem* 1998;44(11):2313-9.
5. Yenari MA. Antiapoptotic and Antiinflammatory Mechanisms of HeatShock Protein Protection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005;1053(1): 74-83.
6. Tsan M, GAO Baochong. Cytokine function of heat shock proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2004;286(4):739-44.
7. Whitehouse CA. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004; (64):145-60.
8. Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:203-14
9. Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoğuz B, Eren S, Baykam N, and Esener H. Characteristics of Patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in a Recent Outbreak in Turkey and Impact of Oral Ribavirin Therapy. *Clin Infect Dis* 2004;39:284-7.
10. Korkmaz M, Yıldırım Y, Özçelik H, Fadiloğlu Ç. Güncel Bir Sorun: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 2008:3-9.
11. Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, ve ark. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, Dengue virus, and Yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, 2002;40(7):2323-30.
12. Watts DM, Ksiazek TG, Linthicum KJ, Hoogstraal H. Crimean-Congo hemorrhagic fever. In Monath TP, ed. *The arboviruses: Epidemiology and ecology*, 1988; 2:177-260.

13. 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;36:1613-8.
14. Crabtree MB, Sang R, Miller BR. Kupe virus, a new virus in the family Bunyaviridae, genus Nairovirus, Kenya. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15(2): 147-54.
15. 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.
16. Bodur H. Kırım-Kongo kanamalı ateşi ve DAS yönetimi. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Ankara, 2007; 509-20.
17. Simpson DIH. Viral haemorrhagic fevers of man. *Bull Wld Hlth Org*, 1978;56(6):819-32.
18. LeDuc JW. Epidemiology of hemorrhagic fever viruses. *Rev Infect Dis*, 1989;11(4):730-5.
19. Vorou RM. Crimean-Congo hemorrhagic fever in southeastern Europe. *Int J Infect Dis*, 2009;13(6):659-62.
20. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol*, 1979; 15(4): 307- 417.
21. Andersson I, Simon M, Lundkvist A, Nilsson M, Holmström A, Elgh F ve ark. Role of actin filaments in targeting of Crimean Congo Hemorrhagic Fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. *J Med Virol.*, 2004;72:83-93.
22. Duh D, Nichol ST, Khristova ML, Saksida A, Bratkovic IH, Petrovec M ve ark. The complete genome sequence of a Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus isolated from an endemic region in Kosova. *Virology Journal*, 2008;5(7):1-6.
23. Kırdar S, Ertuğrul MB. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2009; 10(2):45-52.
24. Midilli K. Kırım Kanamalı Ateşi virüsünün biyolojik ve moleküler epidemiyolojisi. 3. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, Bursa 9-13 Aralık 2007; 195-8.
25. Midilli K, Gargli A, Ergönül Ö, Şengöz G, Öztürk R, Bakar M ve ark. Imported Crimean-Congo Hemorrhagic Fever cases in Istanbul. *BMC Infect Dis*. 2007;6:7-54.
26. Karti SS, Odabasi Z, Kortan V, Yılmaz M, Sonmez M, Caylan R. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (8): 1379-84.
27. Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, Mahanty S, Sanchez AJ, Wagoner KD. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J Virol*. 2004;78(19):10370-7.

28. Elaldı N. Kırım-Kongo Hemorajik Ateş Epidemiyolojisi. C.U. Tıp Fakültesi Dergisi 2004; 26: 185-90.
29. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res. 2008;78(1):125-31.
30. Capua I. Crimean-Congo haemorrhagic fever in ostriches: A public health risk for countries of the European Union? Avian Pathology.1998; 27:117-20.
31. Vatansever Z, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi epidemiyolojisinde çevresel, vektörel, iklimsel değişikliklerin rolü. 3. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, Bursa 9-13 Aralık 2007; 203-6
32. Papa A, Bino S, Velo E, Harxhi A, Kota M, Antoniadis A: Cytokine levels in Crimean-Congo hemorrhagic fever. J Clin Virol, 2006; 36 (4): 272-6.
33. Ergonul O ve Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever:A Global Perspective. Springer, 2007;143-54.
34. Akıncı E, Bodur H, Leblebicioğlu H. Pathogenesis of crimean-congo hemorrhagic Fever. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013; 13: 429-437.
35. Ardalan MR, Tubbs RS, Chinikar S, Shoja MM. Crimean-Congo hemorrhagic fever presenting as thrombotic microangiopathy and acute renal failure. Nephrol Dial Transplant 2006; 21: 2304-7.
36. Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman PA, Greer PW. Immunohistochemical and in situ localization of CCHF. Archives of Pathology, 1997;121(8):839-40.
37. 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(6): 2347-70.
38. Chen JP, Cosgriff TM. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2000;11: 461-83.
39. Simpson DIH, Knight EM, Courtois G, Williams MC, Weinbern MP, Kibukamusoke JW. Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa, human isolations and clinical notes. East Afr Med J 1967;44:87.
40. 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(4): 794-800.

41. Ergonul O and Whitehouse CA: Introduction, O Ergonul, CA Whitehouse (eds):Crimean Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective, 1st ed. Springer, Netherlands, 2007; (1): 3-11
42. Dilber E, Cakir M, Acar EA, Orhan F, Yaris N, Bahat E, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever among children in north-eastern Turkey. *Ann Trop Paediatr.* 2009;29(1):23-8.
43. Tasdelen Fisgin N, Fisgin T, Tanyel E, Doganci L, Tulek N, Guler N, Duru F. Crimean-Congo hemorrhagic fever: five patients with hemophagocytic syndrome. *Am J Hematol.* 2008;83(1):73-6.
44. Connolly-Anderson AM, Moll G, Andersson C, Mirazimi A. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus activated endothelial cells. *J Virol* 2011; 85(15) 7766-74.
45. Aydın ZGG. Transient sinus bradycardia during the course of Crimean-Congo hemorrhagic fever in children. *Ticks and tick-borne diseases*, 2015;6(2): 185-8.
46. Hewlett MJ, Pettersson RF, Baltimore D. Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study. *J Virol.* 1977;21(3):1085-93.
47. Duh D, Saksida A, Petrovec M, Ahmeti S, Dedushaj I, Panning M. Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(11):1769-72.
48. David-West TS. Method for accelerated identification of arboviruses after inoculation of mice. *Appl Microbiol.* 1972;23(3):437-40.
49. Cevik MA, Erbay A, Bodur H, Gülderen E, Baştuğ A, Kubar A, Akinci E. Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. *Int J Infect Dis.* 2008;12(4):374-9.
50. Ozkurt Z. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, *Yoğun Bakım Dergisi* 2007; 7 (1): 85-90.
51. Seçmeer G, Çelik Hİ. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *J. Pediatr inf.* 2010; 4: 152-9.
52. Dokuzoğuz B, Çelikbaş AK, Gök ŞE, Baykam N, Eroğlu MN, Ergönül Ö. Severity scoring of index for Crimean-Congo hemorrhagic Fever and the impact of ribavirin and corticosteroids on fatality. *Clin Infect Dis.* 2013;57(9):1270-4.
53. Ergonul O, Tuncbilek S, Baykam N, Celikbas A, Dokuzoguz B. Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2006; 193: 941-4.

54. Schwarz TF, Nsanze H, Longson M, et al. Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 190-6.
55. Kırbaş A, Özdemir H. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *F.Ü.Sağ. Vet.Derg.* 2012; 26(1):53-60.
56. Tignor GH, Hanham CA. Ribavirin efficacy in an in vivo model of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) infection. *Antiviral Res.* 1993 Dec;22(4):309-25.
57. Bodur H, Erbay A, Akıncı E, Öngürü P, Bayazıt N, Eren SS, Kubar A. Effect of oral ribavirin treatment on the viral load and disease progression in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Int J Infect Dis.* 2011;15(1):e44-7.
58. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic Fever. *Rev Infect Dis* 1989; (Suppl 4): 801-6:114-5.
59. 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): 581-5.
60. Ergönül Ö. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, *ANKEM Derg* 2009; 23 (2): 234-240
61. Ozkurt Z, Kiki I, Erol S. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy, *J Infect* 2006; 52 (3): 207-15.
62. Bakır M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, Bodur H, Tasyaran MA, Vahaboglu H. Crimean Congo hemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicenter study of clinical features and outcome measures. *J Med Microbiol* 2005; 54: 385-9.
63. Kadanali A, Erol S, Ozkurt Z. ve Ozden K. Epidemiological Risk Factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever Patients. *Turkish J. Med. Sci.* 2009;39(6):829-32.
64. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91:14–21.
65. Meister A., Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer research*, 1994;54:1969-75.
66. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 1988; 63(3): 381–8.
67. Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol*; 2007;53:1-2
68. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1998; 188-96

69. Saugstad OD. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatrica*, 1996, 85.1: 1-4.
70. Naito Y. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine*, 2010; 7.5: 36-44.
71. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya; Mimoza yayınları, 1995; 42-4.
72. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 1984; 219: 1-14.
73. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 1990; 49(3): 577-87.
74. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 2001; 54(3): 176-86.
75. De Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999; 26(1-2): 202-26.
76. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*; 2001; 31 (11): 1287-1312.
77. Kurutaş Belge E, İnanç GF, Kılınç M. Serbest Radikaller. *Arşiv*, 2004; 13: 120-13
78. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg*. 1991; 126: 104-5
79. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995; 41: 1819-28.
80. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull*. 1993; 49: 479-80.
81. McCord JM: Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-7.
82. Ripine JE, Bast A, Lankharst. Lipids and The Oxidative Strees Study Group: Oxidative stres in chronic obstructive pulmonary disease. *J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 341-7.
83. Asad SF, Singh S, Ahmad A. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study. *Chem Biol Interact*; 2001; 137: 59-74.
84. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *J. Chem. Rev.*; 1989; 89(24): 503-20.

85. Özkan A, Fışkın K. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidan Enzimler, Türk Hematolojisi-Onkolojisi Dergisi. 2004; 14,:52-61.
86. Södergren E. Lipid peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement, Sweden, Tryck&Medier,2000.
87. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clinica Chimica Acta. 2001;306(1):1-17.
88. Cighetti G, Duca L, Bortone L, Sala S, Nava I, Fiorelli G, Cappellini MD. Oxidative status and malondialdehyde in β -thalassaemia patients. European journal of clinical investigation. 2002;32:55-60.
89. Oberley LW. Representative of polypeptide structure of bovine CuZn SOD. Superoxide Dismutase, 1982; 1:28.
90. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? Free Radic Res. 1996;25: 439-54.
91. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. A report of the panel on dietary antioxidants and related compounds, subcommittees on upper reference levels of nutrients and interpretation and uses of dietary reference intakes. Washington DC. National Academy Press. 2000; 1-506.
92. Chaudiere J, Ferrari Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol. 1999; 37: 949-62.
93. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants in nutrition, health and disease. 1st ed. New York. Oxford University Press. 1994.
94. Buonocore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn. Biol Neonate. 2001; 79: 180-6.
95. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. Am J Obstet Gynecol. 2003; 189:181- 8.
96. Scandalios JG. The rise of ROS. TRENDS in Biochemical Sciences. 2002; 27: 483-6.
97. Zhao J, Liu XJ, Ma JW. DNA damage in healthy term neonate. Early Hum Dev. 2004; 77: 89-98.
98. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition. 2002; 18: 872-9.
99. Rose RC, Bode AM. Biology of free-radical-scavengers- an evaluation of ascorbat. Faseb J. 1993;7:1135-42.

- 100.**Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J.* 1999; 13: 1007-24.
- 101.**Suh J, Zhu BZ, Frei B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant toward lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34: 1306-14.
- 102.**Makarov VG, Makarova M, Selezneva AI. Studying the mechanism of antioxidant effect of vitamins and flavonoids. *Vopr Pitan.* 2005; 74: 10-13.
- 103.**Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1992;669:7-20.
- 104.**Tadmouri GO, and Basak A. N., "b-Thalassemia in Turkey: A Review of the Clinical, Epidemiological, Molecular, and Evolutionary Aspects," *Hemoglobin*, in press, 2000.
- 105.**Burtis CA, Ashwood ER. Vitaminler. Aslan D. Eds. *Klinik Kimyada Temel İlkeler.* Ankara: Palme Yayınları, 2005:548-550,332-334,578-601.
- 106.**Yazıcı C, Köse K. Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2004;13: 56-65.
- 107.**Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, et al. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia* 2002; 18: 563–75.
- 108.**Hightower LE, Guidon PT. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol.* 1989;138:257-266.
- 109.**Rylander MN, Feng Y, Bass J, Diller KR: Thermally Induced Injury Heat-Shock Protein Expression in Cells and Tissues. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1066:222-42.
- 110.**Terzioğlu E: Isı şoku proteinleri. Gümüşdiş G, Doğanavşargil E (Ed.): *Klinik Romatoloji.* Deniz Matbaası, İstanbul, 1999;51-53.
- 111.**Feige U, Morimoto RI, Yahara I, Polla BS. Stress-inducibile cellular responses. *Birkhäuser Verlag.* 1996: 1-489.
- 112.**Iwama GK, Thomas PT, Forsyth RB, Vijayan MM. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 1998;8:35-56.
- 113.**Clark JJ, Muchowski PJ. Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol* 2000;

114. Repasky E, Issels R. Physiological consequences of hyperthermia: heat, heat shock proteins and the immune response. *Int J Hyperthermia* 2002;18(6):486-89.
115. Pirkkala L, Sistonen L. Heat Shock Proteins (HSPs): Structure, Function and Genetics. Turku, Finland 2006.
116. Bukau B and Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998;92: 351–66.
117. Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88: 2874–78.
118. Theyssen H, Schuster HP, Bukau B, Reinstein J. The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* 1996;263: 657–70.
119. Russell R, Karzai AW, Mehl AF, McMacken R. DnaJ dramatically stimulates ATP hydrolysis by DnaK: insight into targeting of Hsp70 proteins to polypeptide substrates. *Biochemistry*, 1999;38(13): 4165-76.
120. Glover JR, Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 1998; 94: 73–82.
121. Ellgaard L, Helenius A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 431–437.
122. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999;248:30-43.
123. Lehner T, Wang Y, Whittall T, McGowan E, Kelly CG, Singh M. Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 629–32.
124. Flohe SB, Brüggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohe S, Kolb H. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 2003; 170: 2340–2348.
125. Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clinical Cancer Research*, 2009;15(1); 9-14.
126. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry*; 2005; 47(5): 119–29.
127. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J. Clinical Biochemistry* 2004; 37: 112– 9.

- 128.**Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik gelişim.1998; 11: 336–41.
- 129.**Papa A, Tsergouli K, Çağlayık DY, Bino S, Como N, Uyar Y, Korukluoglu G. Cytokines as biomarkers of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Journal of medical virology, 2016;88(1);21-7.
- 130.**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.
- 131.**Ha HL, Shin HJ, Feitelson MA, Yu DY. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. World J Gastroenterol. 2010;16(48):6035-43.
- 132.**Kim Y, Narayanan S, Chang KO. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. Antiviral Res. 2010;88(2):227-35.
- 133.**Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus Antiviral Res. 2005; 68(2):66-74.
- 134.**Howard JC, Varallo VM, Ross DC, Faber KJ, Rot JH, Seney S.Wound healing-associated proteins Hsp47 and fibronectin are elevated in Dupuytren’s contracture. Journal of Surgical Research, 2004 117(2), 232-38.
- 135.**Khachatoorian R, French SW. Chaperones in hepatitis C virus infection. World J Hepatol 2016; 8(1): 9-35.
- 136.**Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. Free Radic Biol Med.1996;21(3):335-48.
- 137.**Castro R, Pinzón HS, Alvis-Guzman N. A systematic review of observational studies on oxidative/nitrosative stress involvement in dengue pathogenesis. Colombia Médica : CM. 2015;46(3):135-43.
- 138.**Narayanan A. Alteration in superoxide dismutase 1 causes oxidative stress and p38 MAPK activation following RVFV infection. PLoS One, 2011, 6.5: e20354.
- 139.**Soundravally R, Sankar P, Bobby Z, Hoti L. Oxidative stress in severe dengue viral infection: association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. Platelets, 2008;19(6), 447-54.
- 140.**Aydin H, Yildiz G, Engin A, Yilmaz A, Çelik K, Bakir S. Malondialdehyde, vitamin E, and anti-oxidant enzyme activity levels in patients with crimean-congo hemorrhagic fever. African Journal of Microbiology Research, 2010 ;4(22):2402-09.

141. Aydin H, Guven FMK, Yilmaz A, Engin A, Sari I, Bakir D. Oxidative stress in the adult and pediatric patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Journal of vector borne diseases*, 2013;50(4):297.
142. Lam FW, Vijayan K, Rumbaut RE. Platelets and their interactions with other immune cells. *Comprehensive Physiology*, 2015;
143. Gros A, Ollivier V, Ho-Tin-Noé B. Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front. Immunol.* 2015; 5:67-8.
144. Horkheimer I, Schuster DP. The Role of Platelet-Activating Factor in Sepsis: A Bench-to-Bedside Review. *Advances in sepsis*, 2002; 2(1): 2-7
145. Guner R, Tasyaran MA, Keske S, Hasanoglu I, Kalem AK, Yapar D, Erel O. Relationship between total thiol status and thrombocytopenia in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2012; 43(6):1411-2.
146. Karadag-Oncel E, Erel O, Ozsurekci Y, Caglayik DY, Kaya A, Gozel, MG, Elaldi N. Plasma oxidative stress and total thiol levels in Crimean-Congo hemorrhagic Fever. *Japanese journal of infectious diseases*, 2014;67(1): 22-6.
147. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 1998;92(9):3007-17.
148. Guven FMK, Aydin H, Yildiz G, Engin A, Celik VK, Bakir D, Deveci K. The importance of myeloperoxidase enzyme activity in the pathogenesis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Journal of medical microbiology*, 2013;62(3): 441-45.
149. Messina JP, Pigotta DM, Goldingb N, Duda KA, Brownsteinc JS, Weissa DJ, Nuttalla PA. The global distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2015;109:503-13.
150. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology*, 2006;72(11):1493-505.
151. McConnell J, McAlpine SR. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2013;23(7):1923-28.
152. Heck TG, Schöler CM, de Bittencourt PI. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct* 2011; 29(3):215–26.

- 153.**Lollo PC, Moura CS, Morato PN, Amaya-Farfan J. Differential response of heat shock proteins to uphill and downhill exercise in heart, skeletal muscle, lung and kidney tissues. *J Sports Sci Med* 2013; 12(3):461–66.
- 154.**Tsai TN, Lee TY, Liu MS, Chuang IC, Lu MC, Dong HP, Yang RC. Release of endogenous heat shock protein 72 on the survival of sepsis in rats. *Journal of surgical research*, 2015;198(1):165-74.
- 155.**Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(3):185–94.
- 156.**Dzaman-Serafin S, Telatyńska-Mieszek B, Ciechanowski K. Heat shock proteins and their characteristics. *Pol Merkur Lekarski* 2005;19(110):215–19.
- 157.**Gupta A, Cooper ZA, Tulapurkar ME, Potla R, Maity T, Hasday JD, Singh IS. Toll-like receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release. *J Biol Chem* 2013;288(4):2756–66.
- 158.**Ding XZ, Fernandez-Prada CM, Bhattacharjee AK, Hoover DL. Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages. *Cytokine*. 2001;16: 210–19.
- 159.**Njemini R, Demanet C, Mets T. Inflammatory status as an important determinant of heat shock protein70 serum concentrations during aging. *Biogerontology* 2004;5(1):31-8.
- 160.**Bruce CR. Intramuscular Heat Shock Protein 72 and Heme Oxygenase-1 mRNA Are Reduced in Patients With Type 2 Diabetes Evidence That Insulin Resistance Is Associated With a Disturbed Antioxidant Defense Mechanism. *Diabetes*, 2003;52(9): 2338-45.
- 161.**Afolayan AJ, Teng RJ, Eis A, Rana U, Broniowska KA, Corbett JA, Konduri GG. Inducible HSP70 regulates superoxide dismutase-2 and mitochondrial oxidative stress in the endothelial cells from developing lungs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2014; 306(4):351-60.
- 162.**Hunter-Lavin C, Hudson PR, Mukherjee S, Davies GK, Williams CP, Harvey JN, Child DF, Williams JH Folate supplementation reduces serum hsp70 levels in patients with type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* 2004;9:344–49.
- 163.**Yuan ZQ, Zhang Y, Li XL, Peng YZ, Huang YS, Yang ZC. HSP70 protects intestinal epithelial cells from hypoxia/reoxygenation injury via a mechanism that involves the mitochondrial pathways. *Eur J Pharmacol* 2010;643(2-3):282-88.

- 164.** Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, Comim CM, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, Moreira JCF. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock*. 2011; 35(5), 466-70.
- 165.** Reyes-del valle J. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of virology*, 2005;79(8):4557-67.
- 166.** Marini M, Frabetti F, Musiani D, and Franceschi C. Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol*.1990; 70: 337–50.
- 167.** Mosher DF. Fibronectin. *Prog Hemost Thrombos*. 1980; 5: 111–151
- 168.** <http://www.thsk.gov.tr/dokumanlar/> (son erişim tarihi: 27.12.2015)
- 169.** Fischer CP. Vitamin E isoform-specific inhibition of the exercise-induced heat shock protein 72 expression in humans. *Journal of applied physiology*,2006;100(5):1679-87.
- 170.** Van Herwijnen MJ, Van Der Zee R, Van Eden W, Broere F. Heat shock proteins can be targets of regulatory T cells for therapeutic intervention in rheumatoid arthritis. *International Journal of Hyperthermia*,2013;29(5), 448-54.
- 171.** Choi SP, Lee KA, Park HJ, Lee MS, Kim KC, Lee M, Seo SH, Yoon JS, Byung-Woo J. Expression of Cu/Zn SOD Protein Is Suppressed in hsp 70.1 Knockout Mice *Biochem Mol Biol* 2005;38:111–14.
- 172.** Martín GR, Prieto JP, de Cabo JV, Lus LG, Barberán J, Landa, JMG, Fernández C. Plasma fibronectin as a marker of sepsis. *International journal of infectious diseases*, 2004 ;8(4): 236-43.
- 173.** Bhatia RK, Saleh AA, Bottoms SF, Mammen EF. Elevated fibronectin levels and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1023-33.
- 174.** Kandemir O, Polat G, Sahin E, Bagdatoglu O, Camdeviren H, Kaya A,. Fibronectin levels in chronic viral hepatitis and response of this protein to interferon therapy. *Hepatogastroenterology*. 2004;(57): 811-14.
- 175.** Afonso V, Santos G, Collin P, Khatib AM, Mitrovic DR, Lomri N, Leitman DC. Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human Cu/Zn superoxide dismutase 1 promoter via JNK/AP-1 signaling pathway, *Free Radic Biol Med*. 2006 ; 41(5):709-21.
- 176.** Özgüneş H, Gürer H, Tuncer S. Correlation between plasma malondialdehyde and ceruloplasmin activity values in rheumatoid arthritis. *Clinical biochemistry*, 1995; 28(2): 193-4.

- 177.**Denko CW. Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents and Actions*, 1979;9(4): 333-36.
- 178.**Sako N. Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochemical and biophysical research communications*, 2003;300(4):847-52.
- 179.**Jang IS. Effects of vitamin C or E on the pro-inflammatory cytokines, heat shock protein 70 and antioxidant status in broiler chicks under summer conditions. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 2014; 27(5): 749-756.
- 180.**Novoselova EG, Glushkova OV, Cherenkov DA, Parfenyuk SB, Novoselova TV, Lunin, SM, Fesenko EE, Production of heat shock proteins, cytokines, and nitric oxide in toxic stress. *Biochemistry (Moscow)*, 2006;71(4):376-383.
- 181.**Brault C, Levy PL, Bartosch B. Hepatitis C virus-induced mitochondrial dysfunctions. *Viruses*. 2013;21(3):954-80.
- 182.**Nakagawa SI, Umehara T, Matsuda C, Kuge S, Sudoh M. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007;353(4):882-88.
- 183.**Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, Arumugaswami V, Sun R, Dasgupta A, French SW. The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology*. 2009; 50(6):1756-64.
- 184.**Y Lu, Y Le, Zhao R, Liu YF, Yang SJ. HSP70 induced by Hantavirus infection interacts with viral nucleocapsid protein and its overexpression suppresses virus infection in Vero E6 cells. *Am J Transl Res*, 2009; 1(4): 367-380.
- 185.**Jeewandara C, Gomes L, Wickramasinghe N, Gutowska-Owsiak D, Waithe D, Paranavitane SA, Malavige GN. Platelet activating factor contributes to vascular leak in acute dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015;9(2) :34-59.
- 186.**Molvarec A, Rigó J, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Prohászka Z. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress and Chaperones*, 2009;14(2):151-159.