

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalarında Klinik Seyir ve Apoptoz İlişkisi

M. Samet DEMİREL, Çiğdem KADER, Emine YEŞİLYURT ŞÖLEN, Şebnem EREN GÖK, Ayşe ERBAY

Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Giriş ve Amaç

- Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKA) multisistemik tutulum gösteren, ciddi morbidite ve mortaliteye neden olan bir hastalıktır.
- Olgu fatalite oranı Dünya genelinde %30 olarak bildirilirken, Türkiye'de %5-10 civarındadır.
- Vakaların klinik prognozundaki farklılık tam olarak aydınlatılamamıştır, hastalığın etiopatogenezi ise kısmen aydınlatılabilmektedir.
- Çalışmamız , hastalığın etiopatogenez mekanizmaları ve bunların prognostik faktörlere etkisinin aydınlatılması amacı ile planlanmıştır.
- Yozgat ilinde doğrulanmış KKKA vaka verileri klinik şiddet ve laboratuvar verileri ile birlikte değerlendirilmiştir.

Genel Bilgiler

- Apoptoz ihtiyaç duyulmayan ve artık fonksiyonlarını kaybeden hücrelerin; kendi kendilerini yok ettikleri, genler tarafından kontrol edilen;
- Protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç duyan, organizmada homeostazı sağlayan programlı bir süreci ifade eder.
- Apoptoz iki yolla meydana gelmektedir;
- 1)İnstrinsik (Mitokondriyal) yol
- 2)Ekstrinsik (Fas/TNFR) yolu.

Apoptoz Proteinleri: Clusterin

- Clusterin, apoptoz ve oksidatif stres ile ilişkili olan, 75-80 kDa ağırlığında, disülfür bağı içeren heterodimerik yapıda bir glikoproteindir.
- Clusterinin sekretuar ve intraselüler şekilleri, apoptoz üzerinde zıt etki gösterirler.
- Sekretuar formu, apoptoz için en önemli düzenleyici protein olan Bax (B cell lymphoma 2 (Bcl-2) associated X) proteininin mitokondriye taşınmasını önleyerek anti-apoptotik etki gösterirken;
- İntraselüler formu tam tersi proapoptotik etki gösterir.

Apoptoz Proteinleri: TRAIL

- TRAIL , 281 aminoasitten meydana gelen sitotoksik özellikte ligandır.
- TRAIL, transmembran proteinidir.
- Tumor Necrosis Factor (TNF) sitokin ailesinin üyesi olup inflamasyonda ve hücre reseptörü aracılı apoptotik hücre ölümünde görev yapar.
- Apoptozun ekstrinsek yolağı TRAIL'in hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerinden birine bağlanmasıyla başlar.
- TRAIL uyarımı sonrası intrinsek yolak ise aktive olan kaspazların Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid'i aktive etmeleri ile etkin hale gelir.

Apoptoz Proteinleri: Kaspaz-8

- Kaspaz-8, başlangıçta ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği apoptozda başlatıcı bir proteaz olarak keşfedilmiştir.
- Kaspaz-8'in tükendiği veya inhibe edildiği klasik modeller, sıklıkla apoptozun inhibisyonu ve nekrotik bir yoldan ölüme dönüşüm ile sonuçlanır.
- Kaspaz 8, kaspaz 3'ün aspartat rezidülerini karboksil ucundan keserek kaspaz 3'ü aktifleştirir ve apoptozun hem başlamasını ve hem de gerçekleşmesini sağlar.

Apoptoz Proteinleri: Apaf-1

- Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1), apoptotik proteaz aktivasyon faktörleri olarak ifade edilir.
- Başlatıcı kaspazlardan biri olan kaspaz 9, Apaf-1'e bağlandığı takdirde aktifleşmektedir.
- Apaf-1'e bağlanmasıyla aktifleşen kaspaz 9, kaspaz 3'ün aspartat rezidüsünün karboksil ucundaki peptid bağı kesmek suretiyle kaspaz 3'ün aktifleşmesine sebep olur.
- Böylelikle apoptoz başlama sinyalini oluşturup apoptozun gerçekleşmesini sağlamaktadır.

Apoptoz Proteinleri: Sitokrom-c

- Sitokrom-C yapısında hem grubu ve iki adet sistein içeren bir proteindir.
- Sağlıklı normal hücrelerde, mitokondride membranlar arası boşlukta bulunur.
- Sitokrom-C, apoptoz oluştuğu esnada sitoplazmaya salındığı anda Apaf-1'e bağlanarak apoptozom denilen tekerlek benzeri yapının oluşumunu sağlar.
- Apoptozom oluşumundan sonra kademeli olarak ilerleyen olaylar sonucunda apoptoz başlamış olur.

Yöntem

- Çalışmaya hastanemize başvuran KKKA tanısı kesinleşen 49 erişkin hasta dahil edildi.
- Hastalar, SGS skoru (Şiddet Derecelendirme Skoru) kullanılarak hafif ve ağır vakalar olmak üzere 2 gruba ayrıldı.
- Hafif hasta grubunda 25, ağır hasta grubunda 24 hasta vardı.
- Ağır hasta grubundaki 15 hasta exitus oldu.
- KKKA ön tanısı ile yatırılan hastaların kesin tanısı için kan örnekleri T.C. Sağlık Bakanlığı THSK referans laboratuvarında moleküler yöntemlerle (real time PCR) etkenin analizi yapılarak konuldu.

Yöntem

- Bu yöntemle kesin KKKA tanısı alan hastaların kan örneklerinde apoptoz belirteçleri (Clusterin, TRAIL, kaspaz-8, sitokrom-C, Apaf-1) için incelemeler ELISA yöntemi ile çalışıldı.
- Hafif seyirli hastalar ve ağır seyirli hastaların apoptoz protein düzeyleri hastalığın akut dönemi ve konvelesan döneminde ayrı ayrı hesaplandı.
- Akut dönem olarak semptomlar başladıktan sonraki 3.-6. günler arası;
- Konvelesan dönem olarak semptomlar başladıktan sonraki 10.-14. günler arası esas alındı.

Yöntem

- İstatistiksel analizler STATA 11,0 (College station, Texas, USA) bilgisayar programı ile yapıldı.
- İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Bulgular

- Tablo 1. Hafif seyirli hastaların akut ve konvelesan dönemde median apoptoz protein düzeyleri

Apoptoz proteinleri	Akut Dönem Düzeyleri	Konvelesan Dönem Düzeyleri	P Değeri
Clusterin	0.145	0.242	0.055
Trail	1.529	0.991	<0.001
Caspase-8	0.082	0.111	0.241
Apaf-1	0.514	0.509	0.679
Sitokrom-C	0.783	0.759	0.386

Bulgular Tablo 1.

- Hafif seyirli hastaların akut ve konvelesan dönemde median apoptoz protein düzeyleri karşılaştırıldığında;
- TRAIL düzeyleri hafif hastalarda akut dönemde anlamlı seviyede daha yüksek bulundu ($p < 0.001$).
- Clusterin, kaspaz-8, Apaf-1 ve sitokrom-C düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı.

Bulgular

- Tablo 2. Ağır seyirli hastaların akut ve konvelesan dönemde median apoptoz protein düzeyleri

Apoptoz proteinleri	Akut Dönem Düzeyleri	Konvelesan Dönem Düzeyleri	P Değeri
Clusterin	0.281	0.226	0.286
Trail	2.497	1.625	0.005
Caspase-8	0.225	0.152	0.323
Apaf-1	0.725	0.472	0.249
Sitokrom-C	0.949	0.881	0.919

Bulgular Tablo 2.

- Ağır seyirli hastaların akut ve konvelesan dönemde median apoptoz protein düzeyleri değerlendirildiğinde;
- Trail düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanırken ($p=0,005$)
- Clusterin, kaspaz-8, Apaf-1 ve sitokrom-C düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktu.

Bulgular

- Tablo 3. Hafif hastalar ile ağır hastaların akut döneminin median apoptoz protein düzeylerinin karşılaştırılması

Apoptoz Proteinleri	Hafif Hastalar	Ağır Hastalar	p değeri
Clusterin	0.145	0.282	<0.001
Trail	1.529	2.497	<0.001
Caspase-8	0.082	0.225	<0.001
Apaf-1	0.514	0.725	0.014
Sitokrom-C	0.783	0.948	0.459

Bulgular Tablo 3.

- Hafif hastalar ile ağır hastaların akut döneminin median apoptoz protein düzeyleri karşılaştırıldığında;
- Clusterin, Trail, Kaspaz-8, Apaf-1 düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptandı.
- Ağır hastalarda bu apoptoz proteinleri anlamlı olarak daha yüksek seviyedeydi.
- Sitokrom-C düzeyleri arasında ise anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p=0,45$)

Bulgular

- Tablo 4. Hafif hastalar ile ağır hastaların konvelesan döneminin median apoptoz protein düzeylerinin karşılaştırılması

Apoptoz proteinleri	Hafif Hastalar Konvelesan Dönem Düzeyleleri	Ağır Hastaların Konvelesan Dönem Düzeyleleri	p değeri
Clusterin	0.242	0.226	0.685
Trail	0.991	1.625	0.009
Caspase-8	0.111	0.151	0.089
Apaf-1	0.509	0.472	0.746
Sitokrom-C	0.759	0.881	0.745

Bulgular Tablo 4.

- Hafif hastalar ile ağır hastaların konvelesan döneminin median apoptoz protein düzeyleri karşılaştırıldığında;
- TRAIL düzeyleri ağır hastalarda anlamlı seviyede yüksek saptandı ($p=0,009$).
- Clusterin, kaspaz-8, Apaf-1, sitokrom-c düzeyleri arasında ise anlamlı fark yoktu.

Bulgular

- Clusterinin ağır hastaların tespitinde duyarlılığı % 91.67, özgüllüğü % 64, pozitif prediktif değeri % 89.79, negatif prediktif değeri % 51.73 bulunmuştur.
- TRAIL proteininin ağır hastaların tespitinde duyarlılığı % 87.5, özgüllüğü % 68, pozitif prediktif değeri % 90.43, negatif prediktif değeri % 61.16 bulunmuştur.

Bulgular

- Kaspaz-8 proteininin ağır hastaların tespitinde duyarlılığı % 91.67, özgüllüğü % 84, pozitif prediktif değeri % 97.62, negatif prediktif değeri % 58.44 bulunmuştur.
- Apaf-1 proteininin ağır hastaların tespitinde duyarlılığı % 83.33, özgüllüğü % 60, pozitif prediktif değeri % 83.89, negatif prediktif değeri % 59.01 bulunmuştur.
- Sitokrom-C proteininin ağır hastaların tespitinde duyarlılığı % 58.33, özgüllüğü % 52, pozitif prediktif değeri % 58.86, negatif prediktif değeri % 50.42 bulunmuştur.

Sonuçlar

- Bizim çalışmamızda KKKA hastalarında akut dönemde özellikle ağır hastalarda apoptozun indüklendiği gözlenmiştir
- Hastalığın patogenezinde apoptoz ve apoptoza etki eden proteinlerin önemli yer tuttuğu gösterilmiştir.
- Ağır hastaların tespitinde apoptoz proteinlerinin duyarlılık ve özgüllük oranlarının anlamlı düzeyde olduğu düşünülmektedir.

Sonuçlar

- Akut dönemde yüksek düzeyde tespit edilen apoptoz proteinleri, hastalığın şiddetleneceği yönünde fikir vermektedir.
- Hastalığın şiddetini erken dönemde öngörmek, uygun tedavi yaklaşımlarıyla kalıcı organ hasarını ve mortaliteyi azaltacaktır.