

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSER TANISI KONMUŞ PEDIATRİK HASTALARIN PERİFERAL KAN  
ÖRNEKLERİNDEN BAZI VİRAL ETKENLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Yasin KÖKSAL  
BİYOLOG**

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR**

**2018 – KIRIKKALE**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSER TANISI KONMUŞ PEDIATRİK HASTALARIN PERİFERAL KAN  
ÖRNEKLERİNDEN BAZI VİRAL ETKENLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Yasin KÖKSAL  
BİYOLOG**

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR**

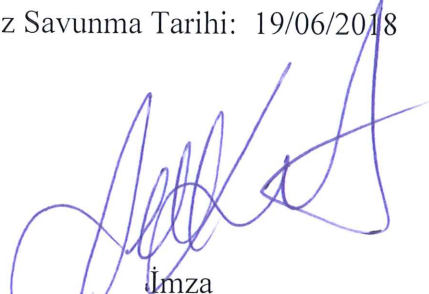
**Bu tez, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (No: 2016/116)  
tarafından desteklenmiştir.**

**2018 – KIRIKKALE**

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi yüksek lisans programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/06/2018



İmza

Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR  
Kırıkkale Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Jüri Başkanı



İmza

Prof. Dr. Şükrü TONBAK  
Fırat Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Üye



İmza

Prof. Dr. Murat YILDIRIM  
Kırıkkale Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Üye

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	
İçindekiler	I
Önsöz	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	V
Şekiller	IX
Çizelgeler	X
<b>ÖZET</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>1. GİRİŞ</b>	3
<b>1.1. Tarihçe</b>	3
<b>1.2. İnsan T-Hücre Lenfotropik Virüsü Tip 1 (HTLV-1)</b>	6
1.2.1. Etiyoloji	6
1.2.2. Replikasyon ve Patogenez	10
1.2.3. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler	12
1.2.4. Tanı	14
<b>1.3. Epstein-Barr Virüsü (EBV)</b>	16
1.3.1. Etiyoloji	16
1.3.2. Replikasyon ve Patogenez	17

1.3.3. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler	21
1.3.4. Tanı	24
<b>1.4. Kaposi Sarkoma İlişkili Herpesvirüs (KSHV)</b>	<b>25</b>
1.4.1. Etiyoloji	25
1.4.2. Replikasyon ve Patogenez	25
1.4.3. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler	28
1.4.4. Tanı	31
<b>1.5. Parvovirüs B19</b>	<b>33</b>
1.5.1. Etiyoloji	33
1.5.2. Replikasyon ve Patogenez	33
1.5.3. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler	34
1.5.4. Tanı	37
<b>2. ONKOVİRÜS KAYNAKLI ÇOCUKLUK KANSERLERİ</b>	<b>38</b>
2.1. Akut Lenfoblastik Lösemi	39
2.2. Akut Lenfoblastik Lösemi İmmunfenotiplendirme	40
2.3. Lenfoma	41
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>43</b>
3.1. Tez kapsamına Alınan Hasta Grupları	43
3.1.1. Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama	44
3.1.2. Schiff Boyama	44
3.2. B ve T hücrelerin Flow Sitometrik Analizleri ve Boyamalar	45

3.3. Örneklerin İzolasyonu ve Saklanması	52
3.4. DNA İzolasyonu	52
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	53
3.6. Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	55
3.7. Real-Time PZR	56
3.8. Klonlama	57
3.9. Plasmid İzolasyonu	58
3.10. Sekanslama	59
<b>4. BULGULAR</b>	59
4.1. PZR Bulguları	59
4.1.1. EBV	60
4.1.2. Parvovirüs B19	61
4.1.3. HTLV-1	62
4.1.4. Kaposi Sarkoma İlişkili Herpesvirüs	62
4.2. Real-Time PZR Bulguları	62
4.3. Klonlama ve Sekans Analizi	65
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	69
<b>KAYNAKLAR</b>	77
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	101

## ÖNSÖZ

Kanserin nedenleri arasında yer alan virüslerin dünya çapında görülen insan tümörlerinin yaklaşık %13-20'si ile ilişkili olduğu görülmüştür. İnsan kanserlerinin yaklaşık %12'si ve gelişmekte olan dünyadaki vakaların %20'den fazlası onkovirüs kaynaklı olduğu rapor edilmiştir. 2014 yılı itibariyle, Kanser Araştırmaları Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) kansere neden olabilecek etmenleri 5 ayrı grupta toplamıştır. Bu gruplar içerisinde ilk sırada; Epstein Barr virüsü HTLV-1 virüsü, Kaposi's Sarkoma virüsü yer almaktadır. Son dönemlerde de Parvovirüs B19'un DNA üzerindeki transformasyonundan kaynaklı kanseri tetiklediğine dair yayınlar çıkmaktadır. Yapılan bu tezde kanser nedenleri arasında gösterilen bu viral etkenleri pediatrik kanser hastalarının tam kan örneklerinde araştırılması amaçlandı.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tezimin hazırlanmasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyip sabırla destek olan değerli hocam, tez danışmanım ve Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR'a;

Yetişmemde büyük katkıları ve emekleri olan yüksek lisans eğitimim süresince, tecrübe ve bilgileriyle bana her zaman yol gösteren laboratuvar ve tez çalışmalarında desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Meltem ÖZGÜNER'e

Tez boyunca desteklerini esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Murat YILDIRIM'a;

Pozitif kontrollerin sağlanmasında yardımcı olan Doç. Dr. Dilek AZKUR'a ve Düzen Laboratuvarlar Grubu'na,

Yüksek lisans eğitimim süresince laboratuvar deneyimi ile bana destek olan ve çalışmalarda büyük katkısı olan Viroloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Emel BIYIKLI'ya;

Her konuda desteğini aldığım, her zaman sabır ve anlayış göstererek benim yanımda olan ve tezi hazırlamamda büyük katkıları olan eşim Uz. Bio Nihal KÖKSAL'a ve beni yetiştiren aileme destekleri ve emekleri için teşekkür ederim.

Tezimi maddi olarak destekleyen Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Kordinasyon Birimi'ne (BAP) teşekkürü bir borç bilirim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIHA	Otoimmün Hemolitik Anemi
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AP	Activating Protein (Aktive Edici Protein)
ATF	Activating Transcription Factor
ATL	Akut T-Hücre Lösemisi
BL	Burkitt's Lenfoma
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CALLA	Common Leukocyte Antigen
CREB	Cyclic AMP-Response Element Binding Protein
CTL	Sitotoksik T-Lenfosit
DC-SIGN	Dendritik Cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin
EBNA	Epstein-Barr Nükleik Antijen
EBV	Epstein-Barr Virüs
Eİ	Eritema İnfeksiyozum
EPHA2	Ephrin type-A receptor 2
ER	Endoplazmik Retikulum
FAK	Fokal Adezyon Kinaz



GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLUT-1	Glikoz Transporter-1
HAM	HTLV-1 Associated Myelopathy (HTLV-1 İlişkili Akut Miyelopati)
HBZ	HTLV-1 Basic Leucine Zipper
HL	Hodgkin Lenfoma
HLA	Human Lökosit Antijen
HPV B19	İnsan Parvovirüs B19
HTLV	Human T-Cell Lymphotropic Viruses
kDa	Kilodalton
KS	Kaposi's sarkoma
KSHV	Kaposi's Sarkoma İlişkili Herpesvirüs
LB agar	Luria-Bertani Agar
LCL	Lymphoblastoid Cell Line
LFA-3	Lökosit Fonksiyon İlişkili Antijen-3
LMP	Latent Membran Proteini
LUR	Long Unique
LTR	Long Terminal Repeat (Uzun Terminal Tekrar)
LYVE	Lenfatik Endotelyal Hyaluronan Reseptör
MHC	Majör Doku Uyumluluk Kompleks
MÖ	Milattan Önce
MRD	Minimal Residual Disease
NES	Nükleer Eksport Sinyal

NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NK	Natural Killer Cell
NS	Parvovirüs B19 Yapısal Olmayan Protein
NPC	Nasopharyngeal Carcinoma
NRP1	Neuropilin 1
ORF	Open Reading Frame (Açık Okuma Çerçevesi)
oriP	Origin of Replication
PAS	Periodic Acid Schiff
PBMNC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Periferik kan mononükleer hücreler)
PEL	Primer Effüzyon Lenfoma
PI-3K	Fosfotidil İnozitol 3-Kinaz
PTLD	Post-transplant Lymphoproliferative Disorder
PRCA	Kronik Saf Kırmızı Hücre Aplazisi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RSV	Rous Sarkoma Virüs
RTA	Replikasyon ve Transkripsiyon Aktivatörü
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SAP	SLAM-associated protein
TAC	Geçici Aplastik Kriz
TAX	Transactivator from the X-gene region
TM	Transmembran
Tm	Melting temperature

TRE	Tax-responsive element
TSP	Tropikal Spastik Paraparezi
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
XLP	X-linked lymphoproliferative disorder



## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> Yapısal ve yapısal olmayan genlerin haritası	7
<b>Şekil 1.2.</b> HTLV-1 ve HTLV-2'nin genom organizasyonu	8
<b>Şekil 3.1.</b> Pas Schiff boyası ile boyanmış insan böbrek kesitleri	45
<b>Şekil 3.2.</b> T-cell ALL flow sitometri görüntüsü	48
<b>Şekil 3.3.</b> B-cell ALL flow sitometri görüntüsü	50
<b>Şekil 4.1.</b> Örneklerin housekeeping gen GAPDH (204 bp) için kurulan PZR sonrasında agaroz jel görüntüsü	59
<b>Şekil 4.2.</b> EBV için primer-2 ile kurulan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonrası görüntüleri	61
<b>Şekil 4.3.</b> Parvovirüs B19 için kurulan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonrası görüntüleri	62
<b>Şekil 4.4.</b> EBV primer-1 ile kurulan real-time PZR amplifikasyon eğrisi grafiği	63
<b>Şekil 4.5.</b> EBV primer-1 ile kurulan real-time PZR Tm grafiği	63
<b>Şekil 4.6.</b> EBV primer-2 ile kurulan real-time PZR amplifikasyon eğrisi grafiği	64
<b>Şekil 4.7.</b> EBV primer-2 ile kurulan real-time PZR Tm grafiği	64
<b>Şekil 4.8.</b> EBV primer-3 ile kurulan real-time PZR amplifikasyon eğrisi grafiği	65
<b>Şekil 4.9.</b> EBV primer-3 ile kurulan real-time PZR Tm grafiği	65
<b>Şekil 4.10.</b> EBV klonlanan <i>E.coli</i> kolonilerinin ampisilinli LB agardaki görüntüsü	66
<b>Şekil 4.11.</b> Kolonilerin EBV primer-3 ile yapılan PZR tarama agaroz jel görüntüsü	66
<b>Şekil 4.12.</b> İzolasyon sonrasında elde edilen plasmidlerin real-time PZR amplifikasyon eğri grafiği	67
<b>Şekil 4.13.</b> Tez çalışmasından elde edilen sekansların diğer sekanslar ile olan filogenetik yakınlıkları	67
<b>Şekil 4.14.</b> EBV pozitif olan 3 örneğin sekans analizi sonrasında yapılan filogenetik analiz sonucu	68

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> HTLV tarafından kodlanan proteinler ve görevleri	8
<b>Çizelge 1.2.</b> Latent Epstein-Barr virüsü antijenleri ve fonksiyonları	16
<b>Çizelge 1.3.</b> Latent Epstein-Barr virüsü antijenleri ve bu antijenlerin gelişen lenfoma tiplerine olan etkileri	20
<b>Çizelge 2.1.</b> Hodgkin lenfoma ayrımsal tanısında kullanılan immünohistokimya markerları	42
<b>Çizelge 3.1.</b> Tez kapsamında incelenen hastalar, tanıları ve alınan örneklerin niteliği	51
<b>Çizelge 3.2.</b> Tezde araştırılan virüslerin hedeflenen genleri ve spesifik primer sekansları	53
<b>Çizelge 3.3.</b> Viral etkenlerin real-time PZR için optimize edilen reaksiyon koşulları	56
<b>Çizelge 4.1.</b> Bu tez çalışmasından elde edilen izolatların birbirleri ile olan benzerlik yüzde matriksleri	68

## ÖZET

Kanser günümüzde yaygınlaşan, uzun ve zorlu bir tedavi süreci olan hastalıklardır. Kanserinin sebeplerine dair birçok araştırma ve çalışma yapılmasına rağmen birçok kanser türünün sebebi tam anlamı ile açıklanamamıştır.

Bu tezde, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma hastanesinde lösemi ve lenfoma tanısı kesinleşen hasta gruplarından tedavi öncesi ve sonrası örneklerinde, Epstein Barr virüs (EBV), Kaposi Sarkoma ilişkili herpesvirüs (KSHV), Parvovirüs B19 (HPV-19) ve İnsan T-hücre Lenfotropik virüsü tip 1 (HTLV-I) virüslerinin varlığı araştırıldı.

Teze, dokuz hasta B cell lenfoma, altı hasta T cell lenfoma, sekiz hasta Hodgkin lenfoma, on hasta lösemi ve lenfoma hastalığından relaps olan gruplardan; olmak üzere toplam 33 hasta alındı. Aynı hasta grupları için Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi onkoloji servisinde tanı alan ve immünsüpresyon tedavisine başladıktan sonraki 33. gün örnekleri çalışmaya dahil edilerek toplam 65 adet tam kan örneği incelendi.

Bu tezde kullanılan örneklerde HTLV-1, Kaposi Sarkoma ve Parvovirüs B19 etkenleri negatif olarak sonuç verirken, 7 hastada (%10.76) EBV genomu tespit edildi. EBV pozitifliği belirlenen hastalar akut lenfoblastik lösemi ve Hodgkin lenfoma tanısı almış hastalardı. Toplam 7 EBV pozitif hastanın 5 tanesi tedavi öncesi örneklerinde, 2 tanesi ise tedavi sonrası örneklerinde pozitif sonuç verdi.

Sonuç olarak, tez çalışmasına aldığımız lösemi ve lenfoma tanılı 33 hastaya ait periferik kan örneklerinde HTLV-1, Kaposi sarkoma ve Parvovirüs B19 viral etmeni tespit edilmezken 7 hasta örneğinde EBV Real time PZR /PZR ile tespit edildi ve amplikonlar sekans analizi ile teyit edildi. Bu tezde elde edilen izolatların sekans ve filogenetik analizleri sonucunda, birbirleri ile yakınlık dereceleri belirlendi.

**Anahtar Sözcükler:** Epstein Barr virüsü, İnsan T-hücre Lenfotropik virüsü tip 1, Kaposi Sarkoma ilişkili herpesvirüs, Parvovirüs B19, PZR

## SUMMARY

Cancer is a disease that is becoming widespread today and that has a long and difficult treatment process. Despite many researches and studies on the causes of cancer, many cancers have not been fully explained.

In present thesis, presence of Epstein-Barr virus (EBV), Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV), parvovirus B19 (HPV B19) and human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) has investigated in pre-treatment and post-treatment (day 33) blood samples taken from patients confirmed with leukemia and lymphoma at the Ankara Children's Health and Disease Hematology Oncology Training and Research Hospital.

Total of 33 patients, consist of nine patients with B cell lymphoma, six patients with T cell lymphoma, eight patients with Hodgkin lymphoma, ten patients with relapsed from leukemia and lymphoma disease, were included. Total of 65 whole blood samples were included that were recently diagnosed in the Ankara Children's Health and Diseases Hematology Oncology Training and Research Hospital.

In this thesis, HTLV-1, KSHV and Parvovirus B19 were detected as negative in patient samples, whereas EBV was positive in seven patients (10.76%). EBV was detected as positive in patients with acute lymphoblastic leukemia and Hodgkin lymphoma. Five out of seven EBV-positive samples were pre-treatment and two out of seven were from the post-treatment specimens.

As a result, HTLV-1, KSHV and Parvovirus B19 could not be detected in the peripheral blood samples whereas EBV was detected in seven patients samples by using Real Time PCR /PCR and amplicons confirmed by sequence analyzing. Sequence and phylogenetic analysis from EBV-positive patients revealed that the isolates obtained from thesis were close to each other.

**Key words:** Epstein-Barr virus, Human T-cell lymphotropic virus type 1, Kaposi's sarcoma associated herpesvirus, Parvovirus B19, PCR

# 1. GİRİŞ

## 1.1.Tarihçe

Kanser, büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımıdır. Somatik ve genetik hastalıkların en sık, yaygın görüleni ve en komplike olanıdır (Futreal ve ark. 2001). Kanser, sağlıklı ve normal bir hücrenin, normal hücresel düzenleme mekanizmalarının bozulması sonucunda kontrol dışı büyümesi ile başlar (Chandar ve Viselli 2012).

Tarih kaydedilmeye başlandığından günümüze kadar insan, hayvan ve bitkilerde kanser vakaları rapor edilmiştir. Kanser bulgularına işaret eden eski çağlara ait bazı ipuçları eski mısır insan mumyalarının fosilleşmiş kemik tümörleri ve eski mısır yazıtlarıdır. Henüz kanser kelimesi kullanılmamışken en eski açıklamalar yaklaşık MÖ 3000 yıllarında eski Mısır'da bulunmuştur. Edwin Smith papirüsü adı verilen bu yazılı metin, travma cerrahisi üzerine yazılmış eski Mısırdaki okutulan ders kitabının bir bölümünün kopyasıdır. Bu papirüste göğüs tümörlü 8 olgunun dağlanarak çıkarıldığından ve hastalığın tedavisinin olmadığından bahseder. Mumyalarda osteosarkoma adı verilen kemik kanserlerine, nazofarengeal karsinomaya ve baş boyun kanserlerindeki kafatası deformasyonuna rastlanmıştır (American Cancer Society 2018).

İnsan kanseri ile ilgili yazılı kayıtlar, Babil Hammurabi (MÖ 1750), Zhou Hanedanlığı (MÖ 1100-400), Çin Ayinleri ve Antik Hint Ramayana el yazmalarında görülmektedir (MÖ-500) (Diamandopoulos 1996, Mackay ve ark. 2006).

Kanser kelimesinin kökeni Hipokratla (MÖ 460-370) başlar. Hipokrat yara oluşturan ve oluşturmeyen tümörleri tarif etmek için “carcinosis” ve “karsinoma” terimlerini kullanmıştır. Hipokrat, kanseri, parmak gibi yayılan çıkıntılarının olmasından dolayı görüntüsünü yengece benzeterek “carcinosis” olarak kullanmıştır. Romalı hekim Celcus (MÖ 28-50) daha sonra Yunanca terimi Latinceye çevirerek “cancer” (yengeç) demiştir. Bir başka Romalı hekim Galen (MS 130-200), tümörleri tanımlamak için “oncos” (Yunancada kütle)



kelimesini kullanmıştır. Günümüzde onkologlar, Hipokrat ve Celsus'un yengeç benzetmesini hala kötü huylu tümörleri tanımlamak için kullanmaktadır. Galen'in terimi onkos ise kanser uzmanlarına onkolog olarak verilen bir unvandır (American Cancer Society 2018).

19. yüzyılda mikroskobun gelişmesi doku ile birlikte bilimsel onkoloji üzerindeki çalışmalar başlamıştır. Aynı yüzyılın sonlarında William Stewart Halsted radikal mastektomi operasyonunu geliştirmiştir (Rankin 2006). Rudolf Virchow hücrel patoloji çalışmaları ile kanser araştırmalarının temellerini atmıştır. Virchow tümörle ilişkili olarak "hiperplazi", "metaplazi", "lösemi" gibi terimleri tanımlamış ve pek çok benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörlerin mikroskobik incelemelerini yapmıştır (Hajdu 2012).

19. yüzyılın sonlarında, Dmitriy Ivanofsky ve Martinus Beijerinck viroloji alanında tütün bitkisinin bulaşıcı patojenini keşfetmişlerdir. Buldukları bu patojen bakterilerden küçük, filtrelerden geçebilen ve sadece canlı hücrelerde çoğalabilen yeni bir enfeksiyon sebebi olan etkenleri "virüs" olarak tanımladılar. Bu sebepten bu iki araştırmacı virolojinin öncüleri olarak gösterilmiştir (Javier ve Butel 2008).

Kanserin oluşumunda bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve farklı kimyasallara kadar pek çok faktör etkilidir (Williams 1992, Williams 2001). Viral ve kimyasal karsinojenler ilk defa 1915 yılında, Tokyo Üniversitesi'nde Katsusaburo Yamagiwa ve Koichi Ichikawa tarafından laboratuvarında ilk defa tavşan derisine kömür katranı uygulanarak hayvanlarda kanserin indüklenmesi ile keşfedilmiştir (Yamagiwa ve Ichikawa 1917).

1907 yılında İtalyan Giuseppe Ciuffo papillomavirüs olarak bilinen siğil virüsünü bulmuştur. 1908 yılında Danimarkalı bilim adamları Vilhelm Ellermann ve Olaf Bang tavuklarda lösemnin kanatlı lösemi virüs ile geliştiğini keşfetmiştir (Fadly ve Nair 2008).

1911 yılında, John Hopkins Üniversitesi'nden Francis Peyton Rous, ilk tümör virüsü olarak da bilinen tavuklarda sarkoma neden olan Rous sarkom virüsünü (RSV) tanımlamıştır. Bu virüs aynı zamanda bilinen ilk RNA virüsüdür. Bu çalışmasından dolayı Rous, 1968'de Nobel ödülüne layık görülmüştür (Rous 1911).

1933 yılında Richard Shope ve E. Weston Hurst pamuk kuyruklu vahşi tavşanlarda siğil virüsü tespit etmiştir. Peyton Rous ve Joseph Beard bu virüsün tümörojenik potansiyelini göstermiş ve bu virüsü pamuk kuyruklu tavşan papillomavirüs (Cottontail rabbit papillomavirüsü; CRPV) olarak isimlendirmişlerdir. CRPV aynı zamanda bilinen ilk DNA virüsüdür (Shope ve Hurst 1933).

1950'li yıllarda İngiliz cerrah Dennis Burkitt, Doğu Afrika'da çalışırken şimdilerde Burkitt's lenfoma olarak bilinen, bir çocukluk çağı tümörünü tanımlamıştır (Burkitt 1962).

1965 yılında Tony Epstein, Yvonne Barr ve arkadaşları elektron mikroskobu kullanarak Burkitt lenfoma hücre hatlarından yeni bir virüs olan Epstein-Barr Virüsü (EBV) izole edip aralarındaki ilişkiyi açıklamıştır (Epstein ve ark. 1965, Henle ve Henle 1966). *Herpesviridae* ailesi içinde yer alan Epstein-Barr virüsü, enfeksiyöz mononükleoza neden olur ve non-Hodgkin lenfoma ve nazofarenks kanseri ile ilişkilidir (Javier ve Butel 2008).

1970 yılında Howard Temin ve David Baltimore, kendilerine 1975 yılında Nobel ödülünü getirecek olan, bir RNA tümör virüsü olan RSV'nin replikasyonu için hem DNA replikasyonunun hem de RNA'dan DNA sentezinin olması gerektiğini göstermiş ve tersine transkriptaz enzimini bulmuştur (Baltimore 1970, Temin ve Mizutani 1970).

RSV replikasyonu için tavuklarda sarkomaya neden olduğu bilinen ve sarkoma kısaltması olarak *src* diye isimlendirilen genin dağılımı araştırılmış ve onkogenlerin hücreli orijinli olduğu, kanserojen olayların bu hücreli genleri aktive ederek kanser oluşturduğu hipotezi 1976 yılında Michael Bishop ve Harold Varmus tarafından gösterilmiştir (Stehelin ve ark. 1976).

1980 de Robert Gallo ve arkadaşları insan T-hücre lenfoma hücrelerinde diğer virüslerden farklı, ilk insan retrovirüsü olan HTLV-1 keşfetmiştir. 1981 yılında ise Yorio Hinuma, Kinya Nagata, Isao Miyoshi ve arkadaşları T Hücreli Lösemili (ATL) hastalardan alınan örneklerde HTLV-1'e ait retroviral parçacıklar tespit ederek, lösemiyle ilişkisini bulmuşlardır (Hinuma ve ark. 1981).

1994 yılında Yuan Chang, Patrick Moore ve arkadaşları DNA fragmanlarını ayıran teknolojileri kullanarak EBV'ye homolog olan Kaposi's sarkoma herpesvirüsü (KSHV) AIDS

(Acquired Immune Deficiency Syndrome; Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu) hastalarının Kaposi's sarkomlu dokularından izole etmişlerdir. Bu virüs keşfedilen ikinci tümorojenik insan herpesvirüsüdür (Chang ve ark. 1994).

## 1.2. İnsan T-Hücre Lenfotropik Virüsü Tip 1 (HTLV-1)

### 1.2.1. Etiyoloji

*Ortervirales* takımında yer alan *Retroviridae* ailesi *Orthoretrovirinae* ve *Spumaretrovirinae* alt ailelerine ayrılmaktadır. *Orthoretrovirinae* alt ailesi *Alpharetrovirüs*, *Betaretrovirüs*, *Gammaretrovirüs*, *Deltaretrovirüs*, *Epsilonretrovirüs*, *Lentivirüs* cinslerine ayrılır. *Spumaretrovirinae* alt ailesi ise *Bovispumavirus*, *Equispumavirus*, *Felispumavirus*, *Prosimiispumavirus*, *Simiispumavirus* cinslerine ayrılır. *Retroviridae* ailesinde pek çok hayvan patojeninin yanı sıra insan T-hücre lenfotropik virüsü (HTLV) de bulunmaktadır. Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi'nin (ICTV) 2017 sınıflandırmasına göre HTLV, "primat T-lenfotropik virüsü" olarak isimlendirilmiştir. HTLV-1, *Retroviridae* ailesinin *Orthoretrovirinae* altailesine ait *Deltaretrovirus* cinsinde yer almaktadır (MacLachlan ve Dubovi 2011, ICTV 2017). İnsanlarda enfeksiyöz karaktere sahip ilk belirlenen retrovirüs, insan T-hücre lenfotropik virüsü tip 1 (HTLV-1)'dir (MacLachlan ve Dubovi 2011, Morrison ve ark. 2015).

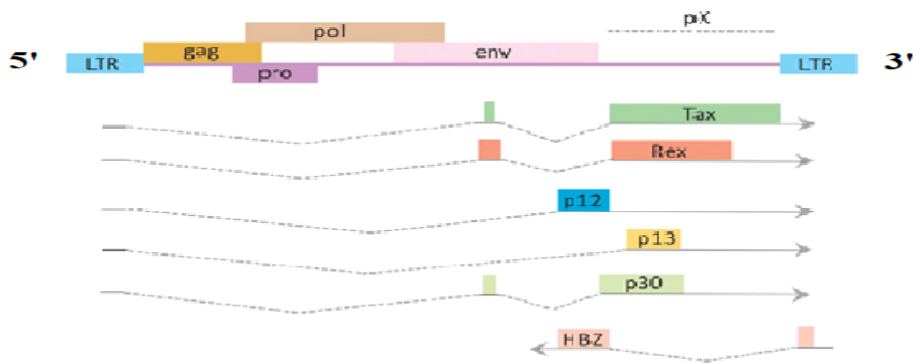
Virion yaklaşık 100 nm çapında, zarflı ve helikal simetridir. HTLV virionu tekli sarmal genomik RNA'nın iki kopyasını içerir. Konakçı hücreye viral giriş ile viral RNA tersine transkripte olur. Prolin için transfer olan RNA primer olur ve konakçı hücre DNA'sına viral genom provirüs olarak giriş yapar (MacLachlan ve Dubovi 2011, Knipe ve Howley 2013).

Tüm retrovirüsler gibi HTLV'nin genom organizasyonu da 5' uçtan 3' uca doğru *gag*, *pro*, *pol*, *env* genlerinden oluşmaktadır. *Gag* geni virionun içyapısal proteinlerini, *pro* geni viral proteazları, *pol* geni tersine transkriptazı, *env* geni ise virionun zarf glikoproteinlerini

kodlar. HTLV-1 genom açıklanması, viral genomun 3' ucunda yer alan 2 regülatör gen tarafından kontrol edilir: *tax* ve *rex* genleri. Tax ve Rex genleri, 3'-LTR ve *env* arasında bulunan "pX" bölümünde kodlanmaktadır. pX bölümü pozitif ipliğinde Tax (p40Tax), Rex (p27Rex), p12, p13, p30 ve p21 proteinleri kodlanır iken bu bölümün negatif ipliğinde ise HTLV-1 b-ZIP faktörü (HBZ) kodlanmaktadır (Şekil 1.1) (Furukawa ve ark. 1991, Kashanchi ve Brady 2005, Bindhu ve ark. 2004, Koralnik ve ark. 1992a).

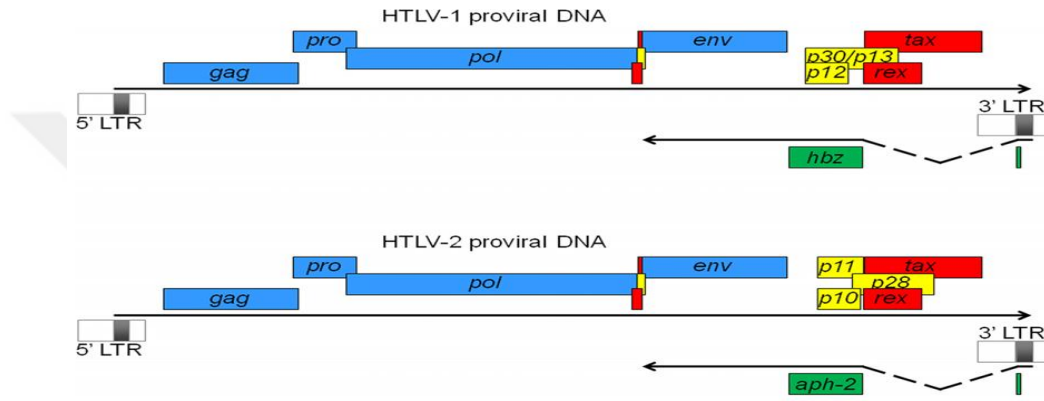
HTLV LTR (Long terminal repeat) bölgesi, U3, R ve U5 bölgelerine ayrılır. U3 bölgesi Tax-1 tarafından aktive edilen transkripsiyon için gerekli olan Tax-1 yanıt element-1 (TRE-1) olarak adlandırılan üç hatlı 21 nükleotit tekrarı içeren bölgedir. U3 bölgesi aynı zamanda mRNA'nın poliadenilasyonu ve sonlandırılmasında sorumlu sekanslar içerir. HTLV-1 ve HTLV-2'nin LTR'nin karşılaştırılmasında diğer bölgeleri korunmamış iken viral gen ekspresyonu için kritik elementler, örneğin 21 nükleotid tekrarlar poliadenilasyon sinyal ve TATA kutusu, iyi korunmuş olarak tespit edilmiştir. R ve U5 bölgeleri mRNA'nın 5' ucunda bulunur viral genomun komplementer ipliği ile kendisine özgü mesaj kodlar ancak HBZ bu durumun dışındadır (Cullen 1992, Curren ve ark. 2012).

HTLV-1, CD4<sup>+</sup> T hücre tropizmine sahip ve kopya sayılarını replikasyon ile değil, konak hücrelerin klonal proliferasyonu ile artırır. Lenfosit immortalizasyonu veya transformasyonu ile en çok ilişkili HTLV-1 proteini olan p42'dir. HTLV-1'in, *env* geninin amino ucundan kodlanan, gp61, gp45 ve gp46 proteinleri, HTLV-1'in en immunojenik antijenleridir (Miller 1996, Sommerfelt 1999, Coakley ve ark. 2005, Martin ve ark. 2016).



Şekil 1.1. Yapısal ve yapısal olmayan genlerin haritası (Matsuoka ve Jeang 2011).

HTLV-1 ve HTLV-2 T hücrelerine tropizm duyar ve bu iki virüsün yaklaşık %60 oranında nükleotit sekans benzerlikleri vardır. İki virüs arasındaki yüzey glikoprotein aminoasit homolojisi %63 iken, membran proteinlerinin aminoasit homolojisi %73'tür (Shimotohno ve ark. 1984, Shimotohno ve ark. 1985). Hem HTLV-1 hem de HTLV-2, hayvan modellerinde viral replikasyonda *in vitro* viral gen ekspresyonunun transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzenlenmesinde hücre sinyalizasyonunda işlev gören çeşitli yapısal olmayan proteinleri kodlar (Knipe ve Howley 2013). HTLV-1 ve HTLV-2 genom organizasyonu arasındaki farklılık **Şekil 1.2**'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.2.** HTLV-1 ve HTLV-2'nin genom organizasyonu (Barbeau ve ark. 2013).

HTLV-1 tarafından kodlanan proteinlerin en önemlileri arasında Tax, Rex, P12, P30, P13 ve HTLV-1 temel lösin zipper faktör (HBZ) bulunmaktadır. Bu proteinlerin fonksiyonları **Çizelge 1.1**'de özetlenmiştir.

**Çizelge 1.1.** HTLV tarafından kodlanan proteinler ve görevleri.

Protein	Fonksiyonu
<b>Tax</b>	40 kDa ağırlığında bir fosfoproteindir. Tax, hücrelerin HTLV-1 immortalizasyonunda, persiste enfeksiyonda, inflamasyonda ve patogeneizde en önemli rolü oynar. Tax, transkripsiyon faktörü NF-kB'yi aktive eder, bundan dolayı bazı hücre genlerinin ekspresyonunu indükler ve bu aktivite HTLV-1 hayat döngüsünün birçok hali için önemlidir. Tax, LTR boyunca HTLV-1 transkripsiyonunu aktive eder. Aynı zamanda hücre döngü düzenleyicilerini, DNA tamiri ve apoptozisi de kapsayan

	<p>hücresel yolağı etkiler (Cann ve ark. 1985, Felber ve ark. 1985, Sodroski ve ark. 1985, Knipe ve Howley 2013, Fujii ve Matsuoka 2013, David ve ark. 2007, Seiki ve ark. 1984, Sodroski ve ark. 1986, Zhao ve ark. 1991 Zhao ve ark. 1992, Lenzmeier ve ark. 1998).</p>
<b>Rex</b>	<p>mRNA çift sarmal ile kodlanan ve 27 kDa bir protein olan Rex-1 (p27Rex) ve p21Rex'in fonksiyonu bilinmemektedir. P21Rex protein ve mRNA HTLV-1 enfekte hücre dizilerinde ve ATL'li hastaların T-hücrelerinde eksprese edilir. Rex-1 mRNA'nın birleşmesini önler, mRNA stabilitesini artırır ve birleşmesi tamamlanmamış mRNA'nın translasyonunu artırır. T-hücre transformasyonuna yardım ettiği düşünülmektedir. Rex-1 aynı zamanda FynB vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1) ve lökosit fonksiyon bağlantılı antijen-3 (LFA-3) ekspresyonunu içerir (Bai ve ark. 2012, Knipe ve Howley 2013, Nakano ve Watanabe 2016).</p>
<b>P12</b>	<p>Endoplazmik retikulumda (ER) ve Golgi kompleksinde lokalizedir. P12 aynı zamanda, ER'da bulunan ve kalsiyum depolanma/salınma olaylarını düzenleyen klaneksin (calnexin) ve kalretikulin (calreticulin) proteinlerini bağlar. P12, ER'daki serbest majör doku uyumluluk kompleks (MHC) sınıf I ağır zincire (MHC I-Hc) bağlanırsa viral olarak enfekte olmuş hücrelerin immün hafızasında rol oynayabilir, viral olgunlaşmayı engeller ve <math>\beta</math>2-mikroglobulin ile etkileşir ve T hücrelerin yüzeyindeki MHC sınıf I ekspresyonunun seviyesini (ektopik olarak eksprese olduğu zaman) düşürür (Koralnik ve ark. 1995, Devid 2007, Ciminale ve ark. 1997, Michael ve ark. 2011, Johnson ve ark. 2000, Jonson ve ark. 2001, Kim ve ark. 2003).</p>
<b>P30</b>	<p>Çift sarmal pX ORF II mRNA tarafından kodlanır. Bu protein transfekte hücrelerin çekirdeğinde ve çekirdekçiğinde lokalizedir. p30'un hücre proliferasyonunda ve viral ekspresyonun düzenlenmesinde birçok rolü vardır. Çekirdekdeki viral mRNA'ya etki ederek çiftli sarmal tax/rex mRNA'nın nükleer eksportunu inhibe eder (Koralnik ve ark 1992a, Ciminale ve ark. 1997, D'Agostino ve ark. 1997, Nicot ve ark. 2004,</p>

	Silverman ve ark. 2004).
<b>P13</b>	ORF II'nin tekli sarmal mRNA ile kodlanan ve HTLV-1 enfekte T hücre dizilerinde olduğu kadar ATLL'li hastaların kültüre edilmemiş lösemik T hücrelerinde bu mRNA bulunmuştur. Ektopik olarak eksprese edilir, P13 transfekte hücrelerin mitokondrilerinde ve çekirdeğinde lokalize olarak gösterilmiştir. P13 ekspresyonu mitokondriyal yapıyı değiştirir ve izole edilmiş mitokondrinin iç zar potansiyelini keser. P13, <i>Ras</i> onkogeni aracılığıyla hücre canlılığını kontrol eder ve <i>in vivo</i> virüs enfeksiyonunun erken evresinde önemli bir biyolojik role sahiptir (Koralnik ve ark. 1992b, D'Agostino ve ark. 1997, Ciminale ve ark. 1997, D'Agostino ve ark. 2002, Desagher ve ark. 1993, Hiraragi ve ark. 2005, Hiraragi ve ark. 2006).
<b>HTLV-1 temel lösin zipper faktör (HBZ)</b>	T-hücrelerin çoğalmasını teşvik eden ve ATL hücrelerinde eksprese edilen bir proteindir. Lösemi oluşumunda hem Tax geni hem de HBZ genlerinin doğrudan rol aldığı bilinmektedir. HBZ sürekli ATL ile ilişkide olan önemli bir HTLV-1 genidir. HBZ mRNA transkriptleri tüm ATL hücrelerinde bulunmuştur ve T-hücrelerin proliferasyonunda HBZ'nin anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir. Fare T-hücrelerinde, RNA fonksiyonu ve protein fonksiyonu arasında ayırım yapan bir HBZ başlangıç kodon mutantının, apoptozisi inhibe ederek ve S fazı girişini teşvik ederek T hücresi proliferasyonunu arttırdığı bulunmuştur. HBZ RNA'sı, apoptozu önleyen bir kaspaz inhibitörü olan Survivin'in transkripsiyonunu teşvik ederek apoptozu zayıflatır. HBZ proteini S fazı girişini teşvik ederken, proinflamatuvar etkileri ile apoptosisi de destekleyebilir (Satou ve ark. 2006, Fujii ve Matsuoka 2013, Martin ve ark. 2016).

### 1.2.2. Replikasyon ve Patogenez

HTLV-1 öncelikli olarak CD4+ T hücrelerini enfekte eder, ancak CD8+ T hücreleri, B lenfositler, endotel hücreleri, myeloid hücreler, fibroblastlar ve diğer memeli hücreleri gibi pek çok farklı hücreyi enfekte etme potansiyeline sahiptir (Ho ve ark. 1984, Longo ve ark. 1984, Yoshikura ve ark. 1984). Çok farklı hücreleri enfekte edebilme özelliği, HTLV-1 zarf glikoproteinlerinin oldukça yaygın olarak bulunan hücre yüzey reseptörlerine bağlanma kapasitesinden kaynaklanmaktadır. Bu yüzey reseptörleri arasında glukoz transporter (GLUT1), heparin sulfat proteoglikan ve nöropilin-1 (NRP-1) yer almaktadır (Manel ve ark. 2003, Jones ve ark. 2005, Ghez ve ark. 2006). HTLV-1 hücreye tutunduğunda yüzey glikoproteini ile konakçı hücre reseptör proteinleri arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan membran füzyonu ile virüs hücreye girer. Hücreye girişi takiben, viral genomu ve viral proteinleri içeren HTLV-1 kapsidi sitoplazmaya salınır. HTLV-1 kapsidi içinde iki adet viral RNA, tersine transkriptaz, integraz ve viral proteaz bulunur. HTLV-1 RNA'sı tersine transkriptaz enzimi ile çift iplikli DNA'ya dönüştürülür (Martin ve ark. 2016). Tersine transkripsiyon kompleksi, konakçı genomuna entegre olmak için hücre çekirdeğine gider. HTLV-1 spesifik bir bölgeyi hedeflemeksizin konakçı genomuna entegre olur. HTLV-1 entegrasyon bölgeleri incelendiğinde, spesifik bir proviral entegrasyon bölgesi tanımlanamamıştır (Derse ve ark. 2007, Cook ve ark. 2014).

Entegrasyon sırasında viral DNA'nın uçlarında iki nükleotitin uzaklaştırıldığı ve entegrasyon bölgesindeki hücresel kısa bir dizilimin duplikasyonu tespit edilmiştir. Bu duplikasyon viral DNA'nın ucuyla hücresel DNA ucunun birleşmesini sağlamaktadır. Entegre haldeki provirüs hücresel RNA polimeraz II enzimi tarafından kopyalanır. HTLV-1 provirüs LTR bölgesi RNA transkripsiyonu için gerekli olan promotor ve enhancer elementleri içerir. Viral transkripsiyonun ana yönlendiricisi olan Tax, hücresel transkripsiyon faktörleri aracılığı ile enfeksiyonun erken safhasında viral transkripsiyonu başlatır. Tax-yanıt element-1 (Tax-responsive element-1; TRE-1) olarak bilinen 21 baz çift uzunluğundaki korunmuş elementler, siklik AMP yanıt elementi bağlayıcı proteine (cyclic AMP response element binding protein; CREB) bağlanır. Tax ayrıca, transkripsiyonun başlatılmasını ve TATA bağlayıcı protein aracılığıyla RNA polimeraz uzamasını sağlar (Franklin ve ark. 1993, Caron ve ark. 1993, Kashanchi ve Brady 2005, Martin ve ark. 2016).

Post-transkripsiyonel regülatör bir protein olan Rex, HTLV-1 mRNA'larının parçalanmasında ve taşınmasında görevlidir. Rex proteininde bulunan aktivasyon alanı çekirdekten dışarı çıkma sinyali içerir ve böylece Rex çekirdek ve sitoplazma arasında hareket



edebilir (Hidaka ve ark. 1988, Palmeri ve ark. 1996). HTLV-1 mRNA'ları sitoplazmaya çıktığında konakçı protein sentezini kullanarak viral proteinler oluşturulur. Serbest ribozomlarda, ikili kesilmiş mRNA'lar enzimatik proteinlere, kesilmemiş mRNA'lar ise yapısal proteinlere sentezlenirler. Tek kesilmiş mRNA'lar ise membrana bağlı ribozomlar tarafından zarf proteinine sentezlenirler (Martin ve ark. 2016).

Viral partikül oluşumu, Gag proteininin sitoplazmadan plazma membranına göç etmesi ile şekillenir. HTLV-1 Gag proteininin plazma membranına nasıl göç ettiği tam olarak anlaşılamamıştır. Gag göçü ile bağlantısı tam kurulamamış olmasına rağmen HTLV-1 enfekte hücreler hücre iskeletinin polarizasyonunu düzenleyebildiği gösterilmiştir (Barnard ve ark. 2005). HTLV-1 Gag nükleokapsit proteini, HTLV-1 genomik RNA'sına bağlanır. Gag-viral genomik RNA, Gag-Gag ve Gag-plazma membranı etkileşimleri viral partikül kurulumunda ve tomurcuklanmasında gereklidir (Qualley ve ark. 2010). Viral proteazlar, viral partikülün salınımı sırasında Gag ve Pol poliproteinlerini keser. Matrix proteini plazma membranı ile yakın ilişki halinde kalırken, kapsid proteini tersine transkriptaz, integraz ve viral RNA'yı kapsayacak bir kabuk oluşturur. Tomurcuklanarak hücreden ayrılan olgun viral partikül eğer enfeksiyöz ise duyarlı diğer hücreleri enfekte eder (Le Blanc ve ark. 2001, Konvalinka ve ark. 2015, Martin ve ark. 2016).

### **1.2.3. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler**

HTLV-1 yetişkin T hücre lenfoma etiyolojik ajanı olarak 1980'lerin başlarında tarif edilmesi ile bulunan ilk onkogenik retrovirüs olmuştur. Kronik myelopati ve uveitin özel tipi (HTLV-uveitis) de HTLV-1 enfeksiyonuyla alakalıdır (Hinuma ve ark. 1981, Mochizuki ve ark. 1994). HTLV-1 Güney Batı Japonya'da endemiktir ve bazı bölgelerde popülasyonun %10'dan fazlasını etkiler aynı zamanda Afrika, Karayipler, İran ve Güney Amerika'da da yaygındır. Bunun yanında çoğu HTLV-1 prevalans çalışmaları kan dönörleri, hamile kadınlar veya endemik bölgelerde alt popülasyonlara dayanırken taramaya girmeyen 20 milyondan fazla insan olduğu düşünülmektedir (Kishihara ve ark. 2001, Proietti ve ark. 2005, Hlela ve ark. 2009).

HTLV-1 ve ATL arasındaki etiyolojik ilişki ATL'nin coğrafik kümeleşme gösterdiği epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir. HTLV-2 olarak sunulan ikinci insan retrovirüsü ilk olarak 1982'de bir lösemi hastasının hücre hattından izole edilmiştir, o dönemde yapılan çalışmalar, HTLV-2 ile herhangi bir insan habis tümörünün bağlantısını henüz gösterememiştir (Kalyanaraman ve ark. 1982).

HTLV-1 virüs hücre ilişkili tanıtımı ile anneden çocuğa sütle beslenmeyle, cinsel ilişkiyle veya kan ve kan ürünleri yoluyla bulaşabilir. HTLV-1'in primer hedef hücreleri CD4+ T hücreleridir, ancak dendritik hücreler, CD8+ T hücreler ve endotelial hücreler gibi diğer hücre tipleri de enfekte olabilir. Hücreden bağımsız virüsün bulaşıcılığının zayıf olduğu ve virüs integre olmuş T hücrelerin oranı yüksek bireylerde bile periferik kanda minimal seviyede bulunduğu düşünülmektedir (Hoxie ve ark. 1984, Manns ve ark. 1992, Stuver ve ark. 1993, Mueller ve ark. 1996, Hanon ve ark. 2000, Derse ve ark. 2001, Li ve ark. 2004, Jones ve ark. 2008, Lambert ve ark. 2009).

HTLV-1; ATL, lenfoma, HTLV-1 ilişkili miyelopati (HAM), tropikal spastik parapareziye (TSP) ve üveitise neden olmaktadır (Miller 1996, Sommerfelt 1999, Coakley ve ark. 2005, Martins ve ark. 2012b, Donhauser ve ark. 2018). Fiziki muayene bulgularında belirgin deri lezyonları, lenfadenopati ve hepatosplenomegali rapor edilmiştir. Bu hastalarda ATL hücrelerinin olgun T-yardımcı fenotip ve girintili çekirdekleri ile karakteristik bir görünüme sahip olduğu ve osteoklastlar sayısının artması ile sık sık hiperkalsemi gözlemlendiği görülmektedir. HTLV-1 Güney Japonya'da coğrafi bir kümelenme göstermektedir ve hamile kadınların yaklaşık %6'sının HTLV-1 ile enfekte olduğu bulunmuştur. Tropikal spastik paraparezi (TSP) ve miyelopati (HAM/TSP) ve üveitisin de HTLV-1 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bronkopnömoni, artrit, polimiyozit ve diğer yangısal rahatsızlıklar bu hastalıklar ile birlikte gelişebilmektedir. Ayrıca, bağışıklık sisteminin bozulması da, HTLV-1 enfeksiyonu ile indüklenebilir olduğu rapor edilmiştir. Şu anda dünya çapında 5-10 milyon insanın enfekte olduğu düşünülmektedir. Japonya'da, yaklaşık 2 milyon kişinin HTLV-1 taşıyıcısı olduğu tahmin edilmekte ve her yıl 700'den fazla ATL vakası teşhis edilmektedir. Avustralya'daki 50 yaşın üzerindeki Aborjinlerin yaklaşık yarısının HTLV-1 ile enfekte olduğu bildirilmiştir (Takatsuki 2005, Giam ve Semmes 2016, Kupferschmidt 2018).

#### 1.2.4. Tanı

ATL' nin, klinik özelliklerine göre; akut, kronik, lenfoma ve smoldering (ağrısız ve alevsiz) olmak üzere dört formu vardır. Akut formda, hücre sayısında artışı, yaygın deri lezyonları, sistemik lenfadenopati, hepatosplenomegali görülmektedir. Lenfoma formunda ise sistemik lenfadenopati ile birlikte periferik kandaki atipik hücrelerin varlığı tanıda patognomiktir. Akut ve lenfoma formunda; agresif olması ve bu hastaların kuvvetli kemoterapiye direnç göstermesi prognoz açısından kötüdür. Kronik formda, lökositlerin sayısında azalma ve bazen deri lezyonları, lenfadenopati ve hepatosplenomegali görülmektedir. Smoldering form, periferik kandaki HTLV-1 provirüs entegrasyonunun gösterildiği az sayıda ATL hücrelerinin varlığı ile karakterizedir. ATL' nin en dikkat çekici özelliği, yüksek kalsiyum seviyesidir bu ise tanıda önemlidir. ATL'de, p53 ve p16 tümör süpresör genlerinde meydana gelen mutasyon ve delesyonlar teşhiste gen analizi açısından önemlidir. HTLV-1'den kaynaklı ATL için teşhis metotları şu şekilde özetlenebilir. ATL teşhisinde T hücre CD4+CD25+ markırlarının açıklanma oranı, lenfoid malignler, hücre morfolojisinde değişimler önemlidir. Smoldering (ağrısız ve alevsiz) ve kronik ATL formlarında, çekirdeğin şeklindeki anormallik, akut forma göre daha azdır. Hastada HTLV-1'e karşı özgül antikorların varlığı ve Southern blotting (veya PZR) gibi teknikler ile tümör hücrelerindeki, HTLV-I provirüsünün entegrasyonu tespiti ile teşhis yapılmaktadır. (Sommerfelt 1999, Panfil ve ark. 2016, Şevik 2013, Coakley ve ark. 2005).

HTLV laboratuvar tanısında Western blotlama, ELISA, aglütinasyon testi, immünofloresan testi ve PZR kullanılmaktadır. HTLV'nin PZR ile belirlenmesinde *tax*, *env*, *gag* ve *pol* genlerine yönelik primerler kullanılmaktadır. HTLV-1 ve HTLV-2 için yüksek oranda korunmuş bölge olan *tax* genine spesifik primerler ile amplifikasyon yapılır. Bunun için sıklıkla SK43 ve SK44 primerleri tercih edilir. Real-time PZR ile tanıda *tax* genine spesifik olan bu primerlere ilave olarak *problar* (SK45, HTLV Tax gibi) da kullanılmaktadır. HTLV-1 ve HTLV-2'nin ayrımı için ise *pol* genine spesifik primerler ile örnekler incelenir (Ono ve ark. 1995, Gallo ve Reitz 2010, Pripuzova ve ark. 2012, Castro ve ark. 2013).

HTLV-1 ve HTLV-2 laboratuvar testleri dünyadaki birçok ülkede organ transplantasyonlarında ve kan transfüzyonlarında rutin olmuştur. Anti HTLV-1/2 antikor serolojik testleri iki ana gruba ayrılır. Serolojik tarama testleri ve doğrulayıcı tarama testleri HTLV-1 antijenlerini tanıyan bazı antikorlar bunları HTLV-2'den dolayı tanıdıklarından serolojik tarama testleri her iki virüs enfeksiyonunu ayırmada kesin değildir. Bu nedenle doğrulayıcı testler HTLV-1 ve HTLV-2 arasındaki farkları ayırmalıdır (Martins ve ark. 2012a).

HTLV-1/2'nin tanısında en çok kullanılan testler arasında; ELISA, indirekt immünofloresans (IFA), western blotlama ve polimeraz zincir reaksiyon (PZR) sayılabilir (Ishihara ve ark. 2014). Hastadan alınan örnek genellikle üç kez test edilir ve iki ya da üç tekrar reaktif ise yeni bir kan örneği alınır ve yeni örnek ELISA ile test edilir. İki ya da üç tekrarda reaktivite tespit edilirse Western Blot test kullanılır (Martins ve ark. 2012a). Western blotlama, tarama testlerinde tekrarlayan reaktivite gösteren örneklerin testinde kullanılan bir doğrulayıcı testtir. Ticari testler normalde antijen olarak HTLV-1'in viral lizati kullanılır, bununla birlikte HTLV-1 ve HTLV-2 rekombinant zarf proteinleri kullanılır. Viral antijenlere reaktivite göstermiyor ise örnek seronegatiflik gösterir; eğer HTLV antijenlere özel reaktiviteli ama seropozitif kriterleri tamamen karşılamıyor ise belirsizlik ve üretici tarafından tanımlanan tüm antijenlere pozitif tepki veriyor ise seropozitif olarak değerlendirilir. Reaktivite profiline bağlı olarak, western blot testi HTLV-1 ve HTLV-2 için tanıda yeterli olmayabilir (Kuramitsu ve ark. 2017).

HTLV dolaşımında yüksek oranda viral RNA bulundurmadığı için HTLV moleküler tanısında serum ya da plazma kullanımı tanı için uygun değildir. Lenfositler için HTLV tropizmi göz önüne alındığında, enfeksiyonun moleküler tanısı için biyolojik örnek seçeneği kandır. Bununla birlikte potansiyel olarak enfekte hücreler içeren farklı biyolojik örnekleri özel araştırmalarda virüs identifikasyonu için kullanılabilir. Şu anda real-time PZR yüksek hassasiyeti ve spesifitesi, düşük kontaminasyon riski, kolay uygulanabilirliği, sonuçları saptamadaki hızı, HTLV-1/2 tanısı için doğrulayıcı serolojik test yerine kullanılabilme özelliğiyle geleneksel PZR yerine tercih edilir (Andrade ve ark. 2010, Costa ve ark. 2011, Waters ve ark. 2011).

### 1.3. Epstein-Barr Virüsü (EBV)

#### 1.3.1. Etiyoloji

Epstein-Barr virüsü (EBV) (Human gammaherpesvirus 4; HHV-4), *Herpesvirales* takımının *Herpesviridae* ailesinin *Gammaherpesvirinae* alt ailesine ait *Lymphocryptovirus* cinsi altında yer almaktadır (ICTV 2017).

EBV olgun virionu 120-180 nm çapındadır. EBV virionları protein kapsit ile çevrili çift iplikli, linear DNA genomu içerir. Kapsit ve zarf arasında protein tegument bulunur ve burada hücre tropizme, konakçı spektrumu ve reseptör tanınması için önemli olan glikoproteinler gömülüdür (Odumade ve ark. 2011). EBV genomu yaklaşık 172 kb uzunluğunda DNA molekülünden oluşmaktadır. EBV genomu kısa ve uzun olarak ikiye bölen 0.5 Kb terminal direkt tekrarlar (TRs) ve internal tekrar sekanslarına sahiptir (IRs). EBV yaklaşık 80 tane protein kodlar ancak bunların çoğu tanımlanamamıştır ve karakterize edilememiştir (Arvin ve ark. 2007). Tanımlanan proteinleri ve fonksiyonları **Çizelge 1.2**'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Latent Epstein-Barr virüsü antijenleri ve fonksiyonları (Grywalska ve Rolinski 2015, Kang ve Kieff 2015).

Latentlik proteini	Görevi
EBNA-1	Sekans spesifik DNA bağlayıcı proteindir ve tüm latent EBV enfeksiyonlarında eksprese edilir. EBV genom replikasyonu, persistenlik ve bölünen hücrelerdeki transkripsiyon için gereklidir. B Lenfositlerin immortalizasyonunda rol oynar. Mitoz sırasında viral episomların replikasyonu ve transkripsiyonu için gereklidir. Hücrede p53 degradasyonunu kolaylaştırır. EBNA-1 mikroRNA'ları (let-7 mikroRNAlar) uyararak latent EBV reaktivasyonunu engeller ve metastazı kolaylaştırır.
EBNA-2	Hücre transformasyonu için viral ve hücrel gen transkripsiyonunu aktive eder. Hücrel transkripsiyon kofaktörleri ile etkileşir. EBV ilişkili B-hücre transformasyonu için gereklidir.

<b>EBNA-3A</b>	Hücrede cMyc transkripsiyonunu baskılar ve EBNA-2 aktivasyonunun etkilerini engeller. Kemokinleri uyarır. Hücrenin G1 fazında kalmasını sağlayarak B-hücre transformasyonunu kolaylaştırır. Notch sinyal yolunu düzenler.
<b>EBNA-3B</b>	EBNA-2 'nin koaktivatörüdür. B-hücre immortalizasyonu için gerekli değildir. Viral tümör süpresörüdür.
<b>EBNA-3C</b>	Hücre proliferasyonunu artırır ve hücrenin G1 de kalmasını sağlar. B-hücre immortalizasyonu için gereklidir, çeşitli hücre döngüsündeki kontrol noktalarının bozulmasını indükler. P53'e bağlı apoptozisi bloke eder. P <sup>Rb</sup> ' un degradasyonunu indükler, c-Myc'yi stabilize eder. Konak hücrelerinde kromatin yeniden modelleme düzenini etkiler.
<b>EBNA-LP</b>	EBNA-2 bağımlı viral ve hücresel gen transkripsiyonu için transkripsiyonel koaktivatördür. Konak DNA 'sındaki transkripsiyon başlangıç noktaları ile etkileşir. P53 ve Prbinaktif etmek için EBNA-2 ile etkileşir. B-hücrelerin immortalizasyonu için yardım eder.
<b>LMP-1</b>	EBV tarafından kodlanan en temel onkogendir. CD40 aktif formunu taklit eder. B-lenfositlerin transformasyonu için gereklidir. NF-Kb, JAK/STAT, p38 sinyal yollarını aktive eder.
<b>LMP-2A</b>	EBV latent enfeksiyona yol açar, BRC sinyal yolunu bloke eder.
<b>LMP-2B</b>	Antijen bağımlı BCR sinyalizasyonunu engeller. B-hücre lenfomalarının oluşmasını tetikler. Hücrede farklılaşmayı baskılar ve epitelyal hücre yayılımını ve epitelyum hücreler arasındaki hareketliliği sağlar.
<b>EBER</b>	EBV tarafından kodlanan en yaygın kodlanmayan RNA'dır. Koloni formasyonunu artırır ve büyümeyi tetikler. PKR ile etkileşir ve apoptozisi engeller. IL-10 ve interferon (INF) sentezini indükler, tip I INF aktive etmek için RIG-1 ile bağlanır. B lenfositlerin immortalizasyonu için esas değildir.
<b>BARF</b>	Bunların protein ürünleri Notch sinyal yolunu modifiye edebilir, B-lenfositlerin immortalizasyonu için gerekli değildir.
<b>mikroRNAlar</b>	BART ve BHRF-1'den transkripte edilir. Hücrelerdeki latent kalmada etkilidir.

### 1.3.2. Replikasyon ve Patogenez

EBV DNA'sı otonom ekstrakromozomal replikasyonu destekleyen yapıdadır ve bu subgenomik DNA "oriP" (origin of replication) olarak ifade edilmektedir. oriP'de replikasyonun başlaması, kromozomal DNA replikasyonu ile senkronizedir ve hücrel replikasyon ile sürdürülür. Viral EBNA-1 (Epstein-Barr Nükleik Antijen-1) proteini oriP'ye spesifik olarak bağlanır ve ardından hücrel replikasyon başlatılır. EBNA-1 replikasyon için gereklidir ancak tek başına yeterli değildir. EBNA-1 gen delesyonu olan EBV'ler sadece virüsle enfekte B hücrelerinde genellikle kromozoma entegre halde bulunur. (Hammerschmidt ve Sugden 2013).

EBV primer olarak insan epitel hücrelerini ve B hücrelerini enfekte eder. EBV perifer kanda dolaşan hafıza B hücrelerinde hayat boyu persiste ve asemptomatik enfeksiyon oluşturur. Diğer herpesvirüslerde olduğu gibi EBV latent ve litik döngüler arasında değişen bir enfeksiyon tablosu oluşturur. EBV hem nazofarenksin, tükürük bezlerinin ve özellikle parotis epitel hücrelerini hem de B lenfositleri enfekte etmektedir. Nazofaringeal epitelyum hücrelerinde viral replikasyon ve reaktivasyon, virüsün vücutta yayılmasına ve B hücrelerini enfekte etmesine olanak sağlar. Epitel hücrelerinin lizisi sonucu enfeksiyöz virionların tükürüğe salınmasına neden olur. Enfekte orofaringeal mukozaya infiltre olan B lenfositleri hücrelerden çıkan virionlarla enfekte olur. EBV zar glikoproteini gp 350/gp220 aracılığıyla kompleman reseptörü CR2'ye (CD22) bağlanır ve B hücrelerine girer. Normalde bu hücrelerde üreyemediği için hayat boyu süren bir latentliği başlatır. Genom burada plazmid olarak persistan kalır ve nispeten az sayıda gen açıklanır (White ve Fenner 2000, Grywalska ve Rolinski 2015, Kempkes ve Robertson 2015). Latent enfeksiyon esnasında virüs küçük bir gen grubunu eksprese eder. Bu genler; 6 adet nükleer antijen (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP), 3 adet latent membran proteini (LMP-1, -2A, -2B), 2 adet küçük kodlanmayan RNA (EBER-1 ve 2) ile BART'tır (Saha ve Robertson 2011). EBV nazofarenksin, tükürük bezlerinin ve özellikle parotis bezinin epitel hücrelerinde çoğalmaktadır. Bu hücreleri lize ederek enfeksiyöz virionların tükürük içinde salınmasına neden olur. Serolojik taramalar yaklaşık olarak bütün çocukların 2-3 yaşına geldiklerinde enfekte olduklarını göstermektedir. Virüsün tükürükte yüksek titrede saçılması bu yolağın veya tükürüğün muhtemel bulaş yolu olabileceğini göstermiştir (Doymaz 2000).

EBV latentliği 3 grupta incelenebilmektedir. Tip I latentlikte EBNA-1 ekspresyonu baskındır ve Tip I Burkitt lenfoma ile mide kanserlerinde gözlenmektedir. Tip II latentlikte EBNA-1, LMP-1 ve LMP-2 latentlik genleri eksprese edilmektedir. Tip II latentlik Hodgkin

lenfoma, nazofaringeal karsinoma ve hemofagositik lenfhistiositozisin şiddetli yangılı olgularında görülmektedir. Tip III latentlikte ise tüm latentlik antijenleri eksprese edilmektedir. Bu tipteki latentlik, EBV enfeksiyonu ilişkili transplantasyon sonrası lenfoproliferatif bozukluk (post-transplant lymphoproliferative disorder; PTLD) olgularında, AIDS-ilişkili lenfomalarda ve lenfoblastoid hücre hatlarında görülmektedir (Grywalska ve Rolinski 2015).

Virüsün *in vitro* olarak B-lenfositleri ölümsüzleştirdiği ve lenfositleri lenfoblastoid hücre dizilerine (Lymphoblastoid Cell line; LCL) dönüştürdüğü varsayılmaktadır (Pope ve ark. 1973). EBV malignant fenotipi oluşturan genleri kodlar. Bu genler (EBNA-2 ve LMP-1'i içeren) hücrel sinyal yollarını aktive eder ve hücrel ölümsüzleşmeye katkıda bulunur (Kutok ve Wang 2006).

EBV en az 44 adet miRNA kodlamaktadır. Bunların çoğunun fonksiyonu bilinmemektedir. Ancak bu miRNA'ların hücre proliferasyonu, latentlik regülasyonu, apoptozis, T-hücre yanıtı, doğal bağışıklık üzerine etkilerinin olduğu bilinmektedir (Navari ve ark. 2018).

EBV, nazal doğal öldürücü hücre/T hücre lenfomaları, nazofarengal karsinoma ve gastrik karsinomaların etiyolojisinde yer almaktadır. Dünya genelinde gastrik karsinomaların yaklaşık %10'u EBV pozitifdir (Cho ve ark. 2016, Iizasa ve ark. 2012). Belirlenmiş bir EBV kodlu proteinlerin grubu bu kanserlerde ekspresedir ve bu hücre proliferasyonunu uyarır bu proteinler hücre fenotipini değiştirerek stromal hücrelerde etkileşimlerini modifiye ederek ve büyümeyi destekleyen lenfokinlere duyarlılığını artırarak kansere katkıda bulunur. Bu aynı zamanda B-lenfositlerin yanlış farklılaşması ile köken alan EBV taşıyan Hodgkin's lenfomalarında konusudur. Bu hücreler normal olarak apoptozise yatkındır ama EBV tarafından apoptozisin engellendiği kabul edilir (Siemer ve ark. 2008).

B-lenfositleri üretmeyen latent enfeksiyonundaki EBV kodlu gen ekspresyonu, *in vitro* üretilen LCL'lerde karakterize edilmiştir. Bu hücrelerde viral genomlar episom olarak bulunur. 1973'te tüm EBV taşıyan hücrelerin EBV kodlu nükleer antijen ya da EBNA olarak adlandırılan bir nükleer antijen eksprese ettiği bulunmuştur (Reedman ve Klein 1973). Daha sonra da EBNA'nın 6 proteinden oluşan bir kompleks olduğu ortaya konulmuş ve bunlara ek



olarak hücre membranına lokalize 3 çeşit protein LMP-1, LMP-2A ve LMP-2B eksprese ettiği anlaşılmıştır (Grywalska ve Rolinski 2015).

**Çizelge 1.3.** Latent Epstein-Barr virüsü antijenleri ve bu antijenlerin gelişen lenfoma tiplerine olan etkileri (Grywalska ve Rolinski 2015).

<b>Latentlik proteini</b>	<b>Gelişen Lenfoma</b>	<b>Latentlik Tipi</b>
<b>EBNA-1</b>	Burkitt lenfoma Hodgkin lenfoma AIDS-Bağlantılı lenfomalar	I, II, III
<b>EBNA-2</b>	AIDS-Bağlantılı lenfomalar	III
<b>EBNA-3A</b>	AIDS-Bağlantılı lenfomalar	III
<b>EBNA-3B</b>	AIDS-Bağlantılı lenfomalar	III
<b>EBNA-3C</b>	AIDS-Bağlantılı lenfomalar	III
<b>EBNA-LP</b>	AIDS-Bağlantılı lenfomalar	III
<b>LMP-1</b>	Hodgkin lenfoma, AIDS-Bağlantılı lenfomalar, Geçgin EBV <sup>+</sup> yaygın büyük B hücre lenfoması, Primer efuzyon lenfoma, Lenfomatoid granulomatosis	II, III
<b>LMP-2A</b>	Hodgkin lenfoma, AIDS-Bağlantılı lenfomalar	II, III
<b>LMP-2B</b>	Hodgkin lenfoma, AIDS-Bağlantılı lenfomalar	II, III
<b>EBERs</b>	Burkitt lenfoma, Hodgkin lenfoma, AIDS-Bağlantılı lenfomalar, Çocukluk sistemik EBV <sup>+</sup> T hücre, EBV <sup>+</sup> yaygın büyük B hücre lenfoması, Kronik infeksiyonla ilişkili yaygın büyük B hücre lenfoması, Primer effuzyon lenfoma	I, II, III
<b>BARFs</b>	Burkitt lenfoma, Hodgkin lenfoma, AIDS-Bağlantılı lenfomalar	I, II, III

EBV nükleer antijeninin (EBNA) çeşitli lokuslarının (EBNA2, -3A, -3B, -3C) farklılıklarına göre EBV iki alt tipe ayrılmaktadır. Tip 1 batı ülkelerinde ve Güneydoğu Asya'da yoğun iken Afrika'da tip 1 ve 2 eşit oranda bulunmaktadır. Bu izolatlar restriksiyon

endonükleaz kesim motiflerine, farklı transformasyon kapasitelerine göre ayrılmaktadır (Odumade ve ark. 2011).

EBV izolatları, virüs kaynaklı B-hücre dönüşümünün başlatılmasında rol aldığı düşünülen bir protein olan nükleer antijeni EBNA 2'yi kodlayan genomun BamHI YH bölgesinde dizi farklılığını gösterdiği belirlenmiştir. A tipi izolatlar (prototip B95-8 EBV gibi), 82-87 kDa EBNA 2A proteinini kodlarken, B türü izolatlar (prototip AG876 EBV gibi), antijenik olarak farklı bir protein olan 75 kDa EBNA 2B proteini kodlar (Rickinson ve ark. 1987).

### **1.3.3. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler**

Epstein-Barr virüs (EBV), 1958 yılında Denis Burkitt tarafından lenfoma kültürlerinde patolojik ve epidemiyolojik özellikleri ile belirsiz bir varlık olarak tarif edilmiştir (Burkitt 1958, Burkitt 1962). EBV en eski insan virüslerinden birisidir ve dünya çapında yetişkin bireylerin %90'ı EBV ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Konakçı hücresi ve immün sistemi ile virüs enfeksiyonu arasındaki denge sayesinde EBV, yaşam boyunca persiste kalarak latent asemptomatik enfeksiyona neden olur (Daskalogianni ve ark. 2015). EBV Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflandırmasına göre Grup 1 karsinojen grubunda yer almaktadır (IARC 2018).

EBV enfeksiyöz mononükleozis sebebidir. EBV'nin birincil etken olduğunun düşünüldüğü hastalıklar arasında Hodgkin lenfoma, mide kanseri, nazofarengeal karsinom (NPC) bulunmaktadır. Ayrıca lenfoid ve epitelyal kökenli birden çok malign hastalıkların etiolojisinde yer aldığı görülmektedir (White ve Fenner 2000).

2009 yılında Tsai ve arkadaşları tarafından EBV litik protein olan Zta'nın da IL-13 ekspresyonunu artırarak B hücre proliferasyonunu kolaylaştırdığı ve EBV ilişkili lenfoproliferatif hastalıkların (örneğin Hodgkin lenfoma) patogeneze katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Tsai ve ark. 2009). HLA sınıf II üzerinde sunumu ve peptit oluşumu ile ilgilidir ve bu nedenden dolayı enfekte B-hücrelerin öldürülmesinde ve sitotoksik EBV özel CD4+ efektör T-hücrelerin aktivasyonunu uyarır (Tagawa ve ark. 2016).

EBV enfeksiyonlarının latent ve replike formları arasında anahtar görevi gören bir protein olan BZLF1 üzerinde yapılan çalışmalar tükürük, PBMNC, plazmada enfeksiyöz mononükleozis'li hastalarda real-time PZR ile viral BZLF1 ekspresyonu, hücredeki DNA miktarı ile korele olduğu görülmektedir (Fagin ve ark. 2017).

EBV insanlarda enfeksiyöz mononükleozis, post-transplantasyon lenfoproliferatif bozukluk, Burkitt lenfoma ve Hodgkin lenfomaya neden olmaktadır:

**İnfeksiyöz Mononükleozis:** Genç çocuklardaki EBV enfeksiyonu asemptomatiktir veya çok hafif seyredir. Ancak, enfeksiyon ergenlik dönemine kadar ertelenirse genellikle sonuç enfeksiyöz mononükleozistir (White ve Fenner 2000). İnfeksiyöz mononükleozisin en şiddetli klinik evresinde periferal kan B hücrelerinin %0.1-1'i virüsü taşıyabilmektedir. Bu hastalarda EBV ile enfekte olan B hücreleri tip III latentlik programı ile ilişkili gen ekspresyonu sergilemektedir ve virüs tarafından indüklenen B hücre çoğalması virüs ile enfekte hücrelerin büyümesiyle ilişkilidir (Kutok ve Wang 2006).

Genetik hastalıklar, akut primer EBV enfeksiyonunun kontrolünde immün sistemin rolünün önemine dikkat çekmektedir. X-bağlantılı lenfoproliferatif bozukluk (X-linked lymphoproliferative disorder; XLP), çoğu patojen enfeksiyonu kontrol edebilen ancak EBV enfeksiyonuna duyarlı olan genç erkeklerde görülen nadir bir durumdur. Çoğu XLP hastası SAP (SLAM-associated protein) veya SLAM (Signaling lymphocyte activation molecule) geninde mutasyona sahiptir. SAP proteini, T ve NK hücrelerinde eksprese edilir ve lenfosit sinyal transdüksiyon yolları ile immün yanıtın düzenlenmesinde etkilidir. Ancak SAP mutasyonlarının EBV'ye karşı aşırı duyarlılığı nasıl oluşturduğu henüz tam anlaşılammıştır (Kutok ve Wang 2006, Purtilo ve ark. 1975, Nichols ve ark. 1998).

**Post-transplantasyon Lenfoproliferatif Bozukluk:** EBV taşıyan B-lenfositlerin proliferasyonu bağışıklığı bastırılmış organ nakli alıcılarında olduğu gibi bağışıklığı zarar gören bireylerde hayatı tehdit edici bir durumdan post-transplantasyon lenfoproliferatif bozukluğa (Post-transplant lymphoproliferative disorder; PTLD) yol açabilir. EBV normalde etkili bir immün cevap ile kontrol edilirken, bağışıklığı zarar gören bireylerde potansiyel tehlikeli bir virüstdür (Klein ve ark. 2010). PTLD durumlarında EBV-pozitif B hücrelerinde diğer latentlik tipleri eksprese edilmesine rağmen en çok tip III latentlik program genleri

eksprese edilmektedir. LMP-1 ve EBNA-2 gibi genleri kodlayan bu tip latentlik ile hücresel büyüme transformasyonu sağlanmaktadır (Kutok ve Wang 2006).

**Burkitt Lenfoma:** EBV ilk defa Afrika'nın tropikal yağmur ormanlarında endemik olan B-hücre türevli çocukluk çağı hastalığı olarak bilinen Burkitt's lenfoma (BL) olgularından üretilen hücre hattında görülmüştür (Klein ve Klein 2009). Burkitt lenfomanın iki klinik formu vardır; endemik ve sporadik. Endemik BL, güney Sahra çölü ve Papua Yeni Gine'de görülmektedir. Afrika'da tanısı konulan endemik BL olgularının %98'inde EBV enfeksiyonu ilişkisi belirlenmiştir. Sporadik BL Ekvatoryal Afrika ve Papua Yeni Gine dışında görülür, çoğunlukla çocukları ve ergenleri etkilemektedir. BL olgularının %30-40'ında EBV ilişkisi belirlenmiştir. BL, HIV taşıyıcılarında sporadik olgulara kıyasla 10-100 kat fazla görülmektedir (Kutok ve Wang 2006).

Ig/C-MYC translokasyonu bir onkogen olan C-MYC'nin esas aktivasyonuna yol açar. Bu, hücre proliferasyonu ile sonuçlanabilir. Çoğu durumda bu gerçekleşmez çünkü MYC aktivasyonu hücreleri apoptozise yatkın hale getirir (Evan ve ark. 1992). Bunu takiben tahminlere göre; BL gelişimi B-hücrelerin belirli bir farklılaşma basamağındaki Ig/C-MYC translokasyonu ile başlar. Aktif Ig genler ile myc'nin esas aktivasyonu apoptozise yol açar. SAP eksikliğinde apoptozis engellenir ve hücre hayatını sürdürür. MYC'nin aktivasyonu proliferasyonu indükler. Translokasyon ile EBV enfekte SAP pozitif hücrelerde apoptozis EBNA-1'in anti-apoptotik etkisi ile etkisiz hale gelebilir. Bundan dolayı EBNA-1'in ekspresyonu ve SAP, Ig/myc translokasyon taşıyan B-hücrelerin kaderini belirler (Evan ve ark. 1992, Nagy ve ark. 2009).

**Hodgkin Lenfoma:** EBV enfeksiyonu ile Hodgkin lenfomanın (HL) ilişkisi virüsün keşfinden beri gözlenmektedir. Hodgkin lenfomanın tüm alttipleri aynı oranda EBV barındırmamaktadır. Örneğin, EBV nodüler lenfosit-predominant HL'da nadir olarak bulunurken, karışık hücreli HL ve lenfosit tükenmesi olan HL olgularında daha sık gözlenmektedir. Nodüler sklerozis HL olgularında seyrek olarak (%15-20) EBV bulunmaktadır. Lenfosit-zengin HL'da ise EBV ilişkisi yoktur (Grywalska ve Rolinski 2015).

#### 1.3.4. Tanı

EBV'nin tanısında kişinin daha önceden enfeksiyon geçirip geçirmediği, mevcut enfeksiyon durumu veya EBV enfeksiyonuna duyarlı olup olmadığı incelenmektedir. Viral kapsit antijeni, erken antijenler ve EBNA'ya karşı oluşmuş antikorların varlığının belirlenmesi ile EBV tanısı yapılmaktadır (CDC 2018). İmmünohistokimya ve floresan antikor testi ile dokularda EBV antijenlerinin araştırılması da uygulanan diğer yöntemler arasındadır. Kullanılan serolojik testler arasında immünofloresan antikor testi, ELISA, komplement fikzasyon testi bulunmaktadır. Vestern blotlama, *in situ* hibridizasyon ve virüs izolasyonu da tanı amacıyla kullanılabilir (Hess 2004). EBV'nin moleküler tanısında ise PZR ve real-time PZR kullanılmaktadır. EBV'nin EBNA-1 (Fellner ve ark. 2014, Ryan ve ark. 2004), EBER-2 (Kleer ve ark. 2002), BamH1W, LMP1, LMP2 ve BZLF1 (Tsai ve ark. 2017, Ryan ve ark. 2004) genlerine spesifik primerler gerek PZR gerek real-time PZR ile EBV tanısında kullanılmıştır.

EBV tanısında ELISA'nın daha önce kullanılan zahmetli immünofloresan deneylerinin yerini almış olması da bu tercihi kolaylaştırmaktadır. Hastalığın erken evresinde, IgM sınıfı EBV kapsit antijeni VCA'ya karşı olan antikorlar yüksek titreye ulaşır ve üç ay gibi bir zaman içerisinde giderek düşmeye başlar. Dolayısıyla bu antikorlar primer enfeksiyon için iyi bir indeks sayılmaktadır. Fakat IgM testlerinde yüksek yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik tespit edildiği için, genetik olarak klonlanmış bir dizi EBV antijenini IgG antikorlarının tespitinde kullanmak ve sonuç profilini değerlendirmek daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Hastalığın başlamasından sonraki birinci ayında EBNA antikorları ilk olarak ortaya çıktığı ve daha sonra persistan kaldığı için titredeki yükselme teşhiste yardımcıdır (EBNA-1'e özgül antikorların, şiddetli kronik aktif enfeksiyona sahip immünyetmezlikli hastalarda tespit edilmediği bilinmektedir). Diğer yandan titreleri hızla düştüğü ve asemptomatik hastalarda bulunmadığı için erken antijene Erken yaygın antijeni, yönelik antikorlar akut, nuksi ve kronik aktif enfeksiyonun teşhis edilmesine yardımcıdır. Viral kapsid antijenine yönelik IgG sınıfı antikorlar, geçirilmiş enfeksiyonun veya immün statünün değerlendirilmesinde en uygun hedeftir (Doymaz 2000).

## 1.4. Kaposi Sarkoma İlişkili Herpesvirüs (KSHV)

### 1.4.1. Etiyoloji

Kaposi's sarkoma-ilişkili herpesvirüs (insan herpesvirüsü-8, human gammaherpesvirus 8; HHV-8), Herpesvirales takımı, *Herpesviridae* ailesi *Gammaherpesvirinae* alt ailesinin *Rhadinovirus* cinsine ait bir DNA virüsüdür (ICTV 2017). Herpesvirüs ailesinin bir üyesi olarak, KSHV yapısı EBV ile benzerlik gösterir. KSHV lipit bir zarf ile çevrelenmiş ve bir zarf ile çevrili bir kapsit içinde paketlenmiş çift sarmallı linear DNA genomu bulunur. KSHV genomu, ORF4 ve gPK8.1A gibi birkaç KSHV özgün litik döngü ilişkili glikoproteinlerin yanı sıra gB, gH, gL, gM ve gN olarak adlandırılan beş korunmuş glikoprotein kodlar. KSHV çoklu KSHV glikoproteinler ile bağlantı yoluyla özel hücre tip spesifik geçit yöntemini belirleyen mevcut konakçı hücre yüzey molekülleri ile geniş hücre tropizmi göstermesine rağmen genellikle kovalent olmayan bağ ile bağlanan gH-GI kompleks daha sonraki KSHV giriş için zorunlu iken hücre yüzeyine virüsün ilk tutunmasında glikoproteinler gB, gPK8.1A anahtar molekül olarak fonksiyon gösterir (Veetil ve ark. 2014, Neipel ve ark. 1998, Chandran 2010, Wang ve ark. 2003, Hahn ve ark. 2012).

KSHV 165-170 kb büyüklüğünde çift zincirli DNA genomuna sahiptir. Yaklaşık 138-140.5 kb uzunluğunda olan ve tüm ORF'leri(açık okuma çerçeveleri, open reading frame; ORF) ihtiva eden uzun tekli bölge (long unique repeat, LUR), genomun her iki ucundaki terminal tekrar sekansları ile kuşatılmıştır. Terminal tekrar sekanslarının sayıları KSHV izolatları arasında farklıdır ve 16-75 kadar bölge barındırabilirler (Wen ve Damania 2010).

### 1.4.2. Replikasyon ve Patogenez

KSHV genomik DNA'sı insanlarda ve hayvanlarda daha çok B lenfositlerinde olmak üzere, monositler, endotelial hücreler ve epitelial hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinde saptanabilmektedir (Ganem 2010, Moore ve ark. 1996). KSHV, konak hücreye girişini ve orada çoğalmasını sağlayan birçok yüzey molekülü içerir. Virüs bu moleküller aracılığı ile konak hücrenin yüzey reseptörüne bağlanarak doğrudan füzyon yoluyla genomik materyalini hedef hücreye aktarır. KSHV, sentezlediği yapısal glikoproteinler (özellikle, glikoprotein L) aracılığı ile konak hücredeki heparin sülfata bağlanır ve hücre yüzeyindeki  $\alpha 3\beta 1$  integrini kendi hücre reseptörü olarak kullanır. KSHV ile integrin etkileşimi sonucunda integrin ilişkili fokal adezyon kinaz (FAK) ve fosfotidil inozitol 3-kinaz (PI-3K) yolları aktive olur. Bu aktivasyon, hücre sitoplazma iskeletinin oluşumunda rol alan GTPaz'lar aracılığıyla hücre iskeletinin yeniden şekillenmesine ve viral genomun konak hücre çekirdeğine ilerlemesine yol açar (Dittmer 2010, Naranatt ve ark. 2005). KSHV, viral genomun replike olarak yeni virionların üretildiği litik faz ve replikasyonun sadece kısıtlı proteinlerde olduğu, virion üretiminin olmadığı latent faz olmak üzere iki farklı genetik program ile enfeksiyon oluşturur (Ganem 2010).

KSHV'in replikasyonu sağlayan ve yapısal proteinleri kodlayan bazı genleri insan hücrelerinde bulunan sitokin, kemokin ve kompleman genleri ile yapısal benzerlik içindedir. KSHV'in insan hücrelerindeki onkojenik etkisinin önemli ölçüde bu genomik benzerlikten kaynaklandığı ileri sürülmektedir. KSHV beş ana alt tipi bilinmektedir. Bunlardan A ve C alt tipleri Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde, B alt tipi Afrika ülkelerinde ve D alt tipi ise Japonya ve Okyanusya'da sık görülmektedir. E alt tipi ise Amerikan yerlilerinde görülen ve en nadir bulunan moleküler alt tipidir (Cassar ve ark. 2010, Dillon ve ark. 2013, Ceserman 2013, Jaber ve Yuan 2013).

Latent enfeksiyon sırasında viral genom konak hücrede ekstrakromozomal bir epizom olarak algılanır ve viral genom ancak konak hücrenin replikasyonu sırasında kopyalanabilir. Bu dönemde sadece dört viral protein ve bir seri miRNA sentezlenir. Latent nükleer antijen 1 (LANA-1) (ORF73), vSiklin (ORF72), vFLIP (ORF71) ve Kaposin (K12) KSHV'nün bilinen latent faz proteinleridir. LANA-1, vSiklin ve vFLIP LTC isimli promotor kontrolünde, Kaposin ise LTD'nin kontrolünde replike olur. Bu dört viral protein, miRNA ile birlikte KS ilişkili tümörlerin patogeneğinde önemli rol oynar (Ganem 2010, Fontana ve ark. 2014, Fiorucci ve ark. 2015).

Giriş yolu ve hücre tropizmine göre KSHV giriş reseptörleri çeşitlilik gösterir. KSHV enfeksiyonunun ilk basamağında duyarlı hücrelerin yüzeyindeki heparan sülfat reseptörlerine viral glikoprotein B (gB) ve K8.1 bağlanması gerçekleşir. Monosit, makrofaj ve B hücrelerinin KSHV enfeksiyonu için DC-SIGN (Dendritik cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin) reseptörünü kullanır. İnsan fibroblastları ve insan endotelial hücreleri üzerindeki çeşitli çalışmalar hücre girişi için integrin  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha V\beta3$ ,  $\alpha V\beta5$  ile viral gB etkileşiminin gerekli olduğunu göstermiştir. Endotelial hücrelerin içine KSHV'nin giriş süreci ve aşağı akım sinyali için önemli olan gH-gL dimere bağlanan konakçı hücre membranındaki efrin reseptör trozin kinaz A2 (EPHA2) identifiye edilmiştir. EPHA2 ile bağlanma KSHV'nin integrin ile başlangıç ilişkisini, bu EPHA2 fosforilasyonuna yol açar, KSHV girişine ve devam eden enfeksiyona olanak sağlayan endositoz ve integrin ilişkili aşağı akım sinyalizasyonu devam eder (Walker ve ark. 2014, Kaleeba ve ark. 2006, Rappocciolo ve ark. 2008, Schafer ve ark. 2015, Hahn ve ark. 2002, Campbell ve ark. 2014).

Hedeflenen hücre tipine bağlı olarak, KSHV özellikle makropinositoz ve klatrin bağlantılı endositoz gibi değişik endositik alım yollarını indüklediği rapor edilmiştir. Endotelial hücrelerde aktin bağımlı, dinamin-bağımsız makropinositoz üreyen KSHV enfeksiyonu için ana yol olarak tarif edilmiştir. Bu olay dinamin-bağımlı klatrin aracılığıyla endositoz ile gerçekleşen insan fibroblastlarındaki giriş yoluyla ters düşer. Tarif edilen yüzey aracılığı ile olayların aşağı akışı, KSHV enfeksiyonu fokal adezyon kinaz (FAK) aktivasyonuna fosforillenmiş Src'ye ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) sinyaline bağlı olduğu bulunmuştur (Raghu ve ark. 2009, Akula ve ark. 2003, Krishnan ve ark. 2006, Veettil ve ark. 2006, Naranatt ve ark. 2003).

Primer enfeksiyonun ardından KSHV aktif olarak replike olur ve yeni virüs partikülleri üretilir ve hücre lizisi ile salınır. Bu aşama süresince KSHV genomu lineardır ve tüm viral genom açıklanır. Litik gen açıklanması, çok erken genlerin açıklanması ile başlar. Çok erken genler replikasyondan bağımsız olarak açıklanır ve ardından erken ve geç genler açıklanır. Bu genler ise hem replikasyon için önemlidir hem de yapısal proteinleri kodlarlar. Latent enfeksiyonda sadece birkaç gen ekspresyonu olurken litik enfeksiyonda birçok gen eksprese olur ve viral replikasyon şekillenir. Litik replikasyon hipoksi, oksidatif stres veya HIV gibi etkenlerle ko-enfeksiyon gibi durumlarda tetiklenebilir. Virüs tarafından kodlanan replikasyon ve transkripsiyon aktivatörü (RTA), diğer litik genlerin aktivasyonunu sağlar ve böylece litik aktivasyon koordine edilir. RTA aktivasyonu sonucunda litik replikasyon süreci başlatılır.



KSHV ile B hücrelerinin enfeksiyonu hayat boyu latentlik oluşturur. KSHV tarafından kodlanan viral interlökin-6 homoloğu (vIL-6) latentlik süresinde düşük düzeyde eksprese edilir ancak litik aktivasyon ile ekspresyon seviyesi artar. KSHV'nin neden olduğu Castleman hastalığındaki IL-6 seviyesindeki bozulmalarda vIL-6 etkisinin de olduğu düşünülmektedir (Pantry ve Medveczky 2009, Wen ve Damania 2010, Bhutani 2015).

KSHV latentlik genleri ORF tarafından kodlanır. Bunlar; ORF K12/Kaposin, ORF71/K13/VFLIP, ORF72/v-cyclin, ORF3/LANA, ORF K10.5/LANA-2/vIRF3 ve mikroRNA'lardır. Genleri ve mikroRNA'ları içeren KSHV latent transkriptlerin fonksiyonu konakçı sinyal yollarını bozmak ve viral persistenliği sağlamaktır (Wen ve Damania 2010, Giffin ve Damania 2014).

### 1.4.3. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler

Kaposi sarkomu (KS) ilk defa 1872 yılında Macar dermatolog Moritz Kaposi tarafından derinin idiopatik çoklu pigmentli sarkomu ve yaşlı Akdeniz erkeklerine özgü, nadir görülen ağrısız tümörler olarak tanımlanmıştır. KS'nin en önemli özelliği bol endotelial hücre çoğalmasdır aynı zamanda bağışıklığı baskılanmış organ nakli hastalarında da görülür ve AIDS ile ilgili en sık görülen kanser türüdür (Moore ve Chang 2003). 1980'den beri KS'ya bir enfeksiyöz ajanın neden olduğu düşünülmektedir. KS AIDS hastalarında normal kişilere oranla 200 kat daha yatkındır ve cinsel olmayan yollardan HIV enfekte bireylerin grubundan AIDS'li homoseksüel veya biseksüellerde 10 kat daha yaygındır. KS AIDS'li hastalarda yeni tümör oluşumu nedeni olarak bilinmektedir ve epidemiyolojik kanıtlar KS gelişiminde cinsel yolla bulaşan faktörlerden başka HIV'de anahtar rol oynar (Talbot ve ark. 2004).

1994 yılında Youan Chang ve Patrick Moore tarafından, kazanılmış bağışıklık eksikliği sendromlu (AIDS) bir hastada Kaposi's sarkoma (KS) deri lezyonundan Kaposi's sarkoma ilişkili herpesvirüs (KSHV) tanımlanmıştır (Chang ve ark. 1994). Kaposi sarkoma, AIDS epidemisinin ilk bulguları arasındadır. AIDS ve Kaposi sarkoma ile ilişkili ciddi morbidite ve mortalite sonucunda pek çok araştırma yapılmış ve bunun sonucunda 1994 yılında KSHV tanımlanmıştır (Cesarman ve ark. 1995, Soulier ve ark. 1995).

Kaposi sarkomu (KS), genellikle deri ve mukoza yerleşimi olan lezyonlar ile karakterize düşük dereceli vasküler bir tümördür. Klasik (Avrupa) tip, endemik (Afrika) tip, AIDS ilişkili (epidemik) ve iatrojenik olmak üzere dört alt tipi tanımlanmıştır. KS'da lezyonlar yama evresi, plak evresi ve nodül evresi olarak adlandırılan ve klinik olarak da tespit edilebilen üç evre geçirmektedir (Radu ve ark. 2012, Grayson ve Pantanowitz 2008, Weiss ve Goldblum 2001).

Kaposi sarkomu en sık AIDS olan kişilerde meydana gelen tümürdür; AIDS hastalarının yaklaşık %15-20'sinde kaposi gelişmektedir. Epidemiyolojik araştırmalar göstermektedir ki, AIDS ilişkili kaposi sarkoma bulaşıcı bir etiyolojiye sahiptir ve yine yapılan çalışmalarda kaposi sarkomanın daha çok eşcinsel ve biseksüel erkekler arasında yaygın olduğu gösterilmiştir (Chang ve ark. 1994). KSHV esasen cinsel yolla bulaşır. Aynı zamanda anneden çocuca bulaşabilir. KSHV bütün populasyonlar da yaygın değildir. Özellikle AIDS kaposi sarkomu Sahra altı Afrika bölgelerinde bulunmuştur. KSHV kaposi sarkoma non-hodgkin, B-hücre, primer effüzyon lenfoma, Castleman hastalığı gibi hastalıklarla ilişkilidir, bu hastalıkların hepsinin ortak yönü immün sistem yetersiz insanlarda görülmesidir. Kaposi sarkomu yaşlı erkeklerde, organ nakli hastalarında, sitotoksik terapi alan yada immünsüpresif insanlarda, frank immün yetersizlik hastalıkları, özellikle de AIDS hastalarında yaygın görülür. Diğer HIV positif insanlara kıyasla HIV pozitif homoseksüel erkeklerde malignansi yüksektir (Kuper ve ark. 2000).

KSHV DNA sekansları kan, plazma, semen ve tükürük gibi çeşitli vücut sıvılarında tespit edilebilir. Bunun yanında enfeksiyonun esas olarak kontamine tükürük aracılığı ile yayıldığı görülmektedir (Dedicoat ve ark. 2004, Koelle ve ark. 1997). AIDS salgınının başlaması ile immün yetmezlikle ilgili neoplazilerde artış olmuş ve KS AIDS ile bağlı en yaygın malignite olarak kabul edilmiştir. EBV aksine, KSHV yaygın bir virüs olmamasına rağmen Afrika popülasyonunda en çok görülen virüstdür (Chadburn ve ark. 2013, Morris 2003, Sitas ve Newton 2001). Kaposi sarkomanın epidemiyolojik ve klinik açıdan 4 formu vardır: Klasik, Afrika (endemik), AIDS ilişkili (epidemik) ve iatrojenik formlar.

**Klasik Form:** Moritz Kaposi tarafından 1872' de Akdeniz ve doğu Avrupalı erkeklerde tanımlanan kaposi sarkoma formudur. Çoğunlukla 40-70 yaş grubunda görülür. Bu formda lezyonlar genellikle alt ekstremitededir. Erkekler kadınlara göre 15 kat daha fazla etkilenmektedir (Curtiss ve ark. 2016, Radu ve Pantanowitz 2013).

**Afrika (endemik) Formu:** Orta Afrikada görülen kaposi sarkomanın endemik formu 1950'lerde raporlanmıştır. Bu formda orta yaştaki erişkin bireyler ve çocuklar etkilenmektedir. Özellikle AIDS salgınından sonraki KS insidensi belirgin biçimde artmıştır. Çok sayıda deri tümörleri alt ekstremitelerde ve/veya lenf nodlarında oluşur (Curtiss ve ark. 2016, Radu ve Pantanowitz 2013).

**AIDS İlişkili Form:**1980'li yılların başında AIDS hastası homoseksüel erkeklerin çoğunda KS şekillendiği belirlenmiştir. Önceleri homoseksüel ilişkinin KS ile ilgisi olduğu düşünülse de 1983 yılında KS'nın immün sistemi zayıflamış kişilerde ortaya çıktığı anlaşılmıştır. AIDS ilişkili KS'nın diğer formlardan en önemli farkı, agresif olarak yayılması ve mukozal dokuyu da etkileyerek iç organlarda fonksiyon bozulmasına ve ölüme neden olmasıdır (Curtiss ve ark. 2016, Radu ve Pantanowitz 2013).

**İatrojenik Form:** Bu form 1970'lerde organ nakli yapılan hastalarda ve uzun süreli immünoşüpresyon tedavisi gören hastalarda gözlenmiştir. Son zamanlarda bu forma ilişkin vakalar artmaktadır. Örneğin uzun süreli kortikosteroid tedavisi gören ve ritüximab, infliximab ve abatacept gibi ilaçların uygulandığı hastalarda KS geliştiği bildirilmiştir. Bu tip hastalarda KS genellikle immünoşüpresif tedavi sonlandırıldığında kendiliğinden gerilemektedir. Organ nakli yapılan hastalarda KS gelişme olasılığı diğer hastalara göre 400-500 kat daha yüksektir. Bu hastalardaki KS gelişmesinin nedeni olarak KSHV reaktivasyonu veya nakledilen organ aracılığı ile enfeksiyon geliştiği düşünülmektedir (Curtiss ve ark. 2016, Radu ve Pantanowitz 2013).

KSHV insanlarda Castleman hastalığına ve primer efüzyon lenfomasına da neden olmaktadır. Castleman hastalığı lenfoproliferatif bir hastalıktır. Multisentrik ve unisentrik olmak üzere farklı prognozlara sahip iki klinik alt gruptan oluşmaktadır. Daha sık görülen hiyalin vasküler tip ve daha nadir görülen plazma hücreli tip olmak üzere iki farklı histolojik alt tipi bulunmaktadır. Hiyalin vasküler tip servikal, subklavikular, abdominal veya torakal lenfadenopati varlığı ile karakterizedir. Plazma hücreli Castleman hastalığında ise ateş,

halsizlik, kilo kaybı ve organomegali ön plandadır. Tanısı lenf nodunun histopatolojik incelenmesi ile konulur. Sayıca artmış kollajenize germinal merkez içeren lenfoid folliküller ile bunların arasında daha çok postkapiller venüllerden oluşan hiperplastik endotel ile döşeli çok sayıda vasküler yapılar gözlenir. KSHV için seropozitivite tanıda önemlidir. Hastalar KS ve Non-Hodgkin Lenfoma gelişimi riski açısından takip edilmelidir (Cesarman 2013, Sturzl ve ark. 2001).

**Primer Efüzyon Lenfoması:** Primer efüzyon lenfoması (PEL), etiyojisinde KSHV'nin rol oynadığı nadir görülen agresif bir lenfoma türüdür. PEL, HIV ilişkili Non-Hodgkin lenfomaların yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır. Klinik prezentasyonu genellikle plevral, parietal ve perikardial boşlukların en az birinde sıvı birikimi ile karakterizedir. B hücreli lenfoma grubunda yer almasına rağmen, tümör hücrelerinde B hücre ilişkili antijenlerde ekspresyon kaybı gözlenmesi tanıda önemlidir. PEL hastalarında EBV ko-infeksiyonu ve immünosupresyon sıklıkla görülebilmektedir (Cesarman 2013, Sturzl ve ark. 2001, Luan ve ark. 2010)

#### 1.4.4. Tanı

KSHV tanısında serolojik testlerden immünofloresan antikor testi, immüno blotlama ve ELISA kullanılmaktadır. Moleküler testlerden PZR ve real-time PZR kullanılmaktadır. PZR için hedeflenen genler farklılık göstermektedir. ORFK1, ORFK2, ORF26, ORFK9, ORF72, ORF73, ORF74, K6 gibi farklı gen bölgelerine spesifik primerler ile PZR çalışmaları yapılmıştır (Pan ve ark. 2001, Gogineni ve ark. 2013).

Kaposi sarkomu diğer benign ve malign vasküler neoplazmlardan ve inflamatuvar bir süreçten ayrımı yapılması gereken ancak özellikle erken evre lezyonlarda ve atipik yerleşimli lezyonlarda tanı aşamasında oldukça zorlanılan bir tümördür. KS lezyonları farklı antijenik profiller eksprese eden heterojen hücrelerden oluşur. Bu farklı antijenik yapılar immünohistokimyasal belirleyiciler olarak tanı aşamasında kullanılmaktadır (Fatahzadeh 2012, Pantanowitz ve ark. 2010).

KSHV, KS ayırıcı tanısında kullanılan sensitivitesi ve spesifitesi en yüksek immünohistokimyasal belirleyicidir. LANA-1 KSHV'in konak hücre DNA'sına bağlanmasında görev alan bir latent faz proteinidir. KS lezyonlarında çoğu hücre latent fazdadır. Sadece %5'ten az bir grup hücre litik faza geçer. Bu yüzden KS lezyonlarında LANA-1 için çoğu tümör hücresinde intranükleer immünoreaksiyon gözlenir. LANA-1 tümörün evresinden, histolojik tipinden, klinik/epidemiyolojik alt tipinden bağımsız olarak tüm KS lezyonlarında pozitifdir (Fisher ve ark. 2013, Pantanowitz ve ark. 2010). Faktör VIII-rAg, CD31 ve CD34 gibi endotele özgül belirleyiciler tanı aşamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Faktör VIII-rAg kan damarı endotelinden köken alan benign ve "borderline" tümörlerde yüksek sensitivite ile kullanılabilir. Ancak KS tanısında ve özellikle anjiosarkom ve anaplastik KS gibi yüksek dereceli vasküler tümörlerin ayırımında yetersiz kalmaktadır. CD34 vasküler diferansiyasyonun iyi bir göstergesi olan, ancak vasküler tümörler için spesifik olmayan bir glikoproteindir. CD34 leyomyosarkom, periferik sınır kılıfı tümörü, epitelioid sarkom, dermatofibrosarkoma protuberans ve gastrointestinal stromal tümörler tarafından da ekprese edilebildiği için endotelial diferansiyasyon belirleyicisi olarak tek başına kullanılmamalıdır. CD31 yumuşak dokunun endotelial neoplazmları için daha spesifiktir. CD34 KS'de ileri evre lezyonlarda CD31'e nazaran daha kuvvetli boyanma gösterir (Weiss ve Goldblum 2001, Errihani ve ark. 2011, Pantanowitz ve ark. 2010). D2-40, vasküler endotelde ekprese edilen bir glikoprotein olan podoplanin antijenine bağlanarak etki eder. KS lenfanjiom, hemanjiyoendotelyom gibi çeşitli lenfovasküler neoplazmlarda D2-40 için immünoreaktivite görülebildiği gibi, vasküler kökenli olmayan bazı neoplazmlarda da reaksiyon izlenebilir. Lenfatik endotelial hyaluronan reseptör 1 pozitifliği genellikle lenfatik damarlarda, lenf nodunda, karaciğer ve dalakta görülen endotelial proliferasyon ile sınırlıdır. D2-40, LYVE-1'e göre daha spesifik bir lenfatik belirleyicidir. D2-40 ve LYVE-1 anjiosarkomda da pozitif reaksiyon verebilir (Pantanowitz ve ark. 2010). Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 3, Prox-1 ve Bcl-2 pratikte çok kullanılmamakla birlikte KS'de pozitif reaksiyon veren diğer immünohistokimyasal belirleyicilerdir. KSHV ile infekte tümör hücrelerinde apoptozu engelleyebilecek bazı proteinlerin ekspresyonunda artış gözlemlenmektedir ve Bcl-2 de bu proteinler arasında yer alır. Bunlara ek olarak iğsi hücreli karsinom, malign melanom, gastrointestinal stromal tümör gibi diğer neoplazmları dışlamak için, KS tanısında sensitivitesi ve spesifitesi düşük olsa da, ayırıcı tanı için gerekli olan S-100 protein, pansitokeratin, c-Kit (CD117) ve benzeri belirleyiciler ile immünohistokimya panelini genişletmek gerekmektedir. KS'nin CD34 için sıklıkla, CD117 için ise nadiren

pozitif reaksiyon vermesi gastrointestinal stromal tümör ayırıcı tanısında zorluklara sebep olabilmektedir (Pantanowitz ve ark. 2010, Weiss ve Goldblum 2001).

## **1.5. Parvovirüs B19**

### **1.5.1. Etiyoloji**

Başlangıçta serum parvovirüs-benzeri partikül ya da insan parvovirüsü olarak adlandırılmış olsa da bu yeni virüsün biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerinden dolayı *Parvoviridae* ailesinin bir üyesi olduğu 1985 yılında resmen kabul edilmiş ve Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi tarafından ailenin diğer üyeleri ile karışmaması için parvovirüs B19 olarak adlandırılmıştır (ICTV 2017, Mortimer ve ark. 1983, Cohen 1995).

Parvovirüs B19, 18-26 nm büyüklüğünde zarfsız ikosahedral yapılu bir DNA virüsüdür. Yapı olarak DNA virüsleri arasında en küçük olanıdır. Viral genom 5.5 kb uzunluğunda negatif polariteli lineer, tek iplikli DNA'dır. Viral kapsid VP-1 ve VP-2 olmak üzere iki yapısal proteinden oluşur. VP-2 kapsidin majör proteindir. Virüsün diğer bir proteini yapısal olmayan proteindir (NS-1) ve hücre ölümü ile ilişkilidir (Murray ve ark. 1998).

### **1.5.2. Replikasyon ve Patogenez**

İnsan parvovirus B19 (HPV-B19), eritema enfeksiyozunun etiyolojik ajanıdır. Altta yatan kronik hemolitik bozukluklara sahip bireylerde, HPV-B19 geçici aplastik krizlere (TAC) neden olur. İmmün sistemi baskılanmış bireylerde, persistan HPV-B19, kronik saf kırmızı hücre aplazisi (PRCA) olarak ortaya çıkar. Son olarak, HPV-B19 çocuklarda otoimmün

hemolitik aneminin (AIHA) bir nedeni olarak görülmüştür. HPV-B19'un hücrel reseptörü, eritroid öncüleri için viral tropizmi açıklayan kan grubu P antijendir (Zikidou ve ark. 2018).

P antijeni, parvovirüs B19'un gözlenen tropizmi ile tutarlı olarak eritroid progenitörleri üzerinde eksprese edilir. Bununla birlikte, P antijeninin varlığı, Parvovirüs B19'un tropizmini eritroid hücrelerine açıklamak için yeterli değildir. P antijeni ayrıca megakaryositler, endotelyal hücreler ve fetal miyositler üzerinde de mevcuttur. Ancak, bu hücre tiplerinin hiçbirinin Parvovirüs B19 replikasyonu için uygun olmadığı gösterilmiştir. Parvovirüs B19 genomu içeren plazmidler ile permisif ve nonpermisif hücrelerin transfeksiyon çalışmaları, Parvovirüs B19 için enfekte olmayan hücrelerde tam uzunlukta transkript üretiminin engellenebileceği, sitotoksik NS1'in ekspresyonuna yol açtığını ancak kapsid transkriptlerinin üretilmediğini göstermektedir. Alternatif olarak, tropizm, henüz tanımlanmamış bir ikinci reseptörün varlığına aracılık edebilir. Bununla birlikte, bu hücre tipleri üzerindeki P antijeninin ekspresyonu, transplasental enfeksiyona aracılık edebilir, eritema infeksiyozumun dökülmesine katkıda bulunabilir veya miyokardite yol açabilir. Ayrıca, P-antijen ekspresyonunun seviyesi, viral bağlanmanın etkinliği ile ilişkili değildir, Parvovirüs B19'un insan hücrelerine verimli bir şekilde girmesi için varsayılan bir hücrel ko-reseptörün varlığına ilişkin daha fazla kanıt sağlar (Brown ve ark. 2000, Heegaard ve Brown. 2002).

### **1.5.3. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler**

Parvovirüs B19 ilk kez 1975 yılında İngiltere'de Cossart ve arkadaşları tarafından asemptomatik kan donörlerinden alınan serum örneklerinin hepatit B virüsü antijeni yönünden araştırılması sırasında B19 kodlu örnekte tesadüfen tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda parvovirüs B19'un kronik hemolitik anemili hastalarda geçici aplastik kriz çocuklarda döküntülü yaygın bir hastalık olan eritema infeksiyozum (Eİ), nonimmün hydrops fetalis, artropati ve immün yetmezliği olanlarda kronik anemiye neden olduğu tespit edilmiştir (Brennand ve Cameron 2000, Kerr 2000, Bonvicini ve ark. 2017).

Parvovirüs B19, insan kemik iliğinin eritroid progenitor hücreleri üzerinde oldukça etkilidir. Eritropoezin geçici olarak durdurulmasına ve hematolojik bozuklukları olan ve bağışıklık yetersizliği olan hastalarda ağır komplikasyonlara sebep olmaktadır (Anderson ve ark. 1987, Siegly ve Cassinotti 1998, Bonvicini ve ark. 2017). Gönüllü vericilerde yapılan çalışmalarda eritrosit öncüllerindeki litik enfeksiyonun etkisi ile hematopoezin durduğu görülmüştür. Normal eritroid döngüsü olan hastalarda eritrosit üretiminin kısa süreli durması anemiye neden olmamaktadır. Parvovirüs B19 ile deneysel olarak enfekte edilen gönüllülerden inokülasyondan 10 gün sonra alınan kemik iliği aspiratlarında eritroid hücrelerin tüm gelişme evrelerinin tam bir yokluğu görülmüştür. Hematolojik olarak normal kişilerde eritrosit üretimindeki durma klinik belirsizliğini korumaktadır (Potter ve ark. 1987, Kerr 2000, Arabzadeh ve ark. 2017).

4-6 yaş grubu çocuklar enfeksiyondan en çok etkilenen gruptur. Çoğu toplumda, antikor prevalansı 1-5 yaş grubu arası çocuklarda % 2-15, 6-9 yaş grubu çocuklarda % 20-40 ve 11-19 yaş grubu çocuklarda % 35-60'a ulaştığı görülmektedir. IgG pozitifliğinde en büyük artış oranı parvovirüs B19 enfeksiyonunun en genel belirtisi olan eritema infeksiyozumun en çok görüldüğü okul çağı çocuklarındadır (van Elsacker-Niele ve Kroes 1999, Brown 2000).

Çocuklarda ve ergenlerde en yaygın görülen klinik bir tablo olan eritema infeksiyozuma neden olur. Parvovirüs B19'un neden olduğu eritroid progenitor hücrelerdeki hasar, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda ağır anemiye neden olabilir. Buna ek olarak, parvovirüs B19 enfeksiyonu diğerleri arasında nörolojik ve miyokard enfeksiyonları gibi birçok klinik semptom ile ilişkilendirilmiştir. Parvovirüs B19 enfeksiyonu, genellikle ateş ve döküntü ile ilişkilidir ve birçok kez yanlışlıkla kızamık olarak rapor edilebilir. Parvovirüs B19, gebelerde ise herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir ve fetusta ciddi ve hatta ölümcül komplikasyonlara neden olabilir (Oliveira ve ark. 2017).

Parvovirüs B19 DNA'sı insan dokularında ömür boyu devam etmekle birlikte onu barındıran hücre tipi belirsizliğini sürdürmektedir. Yapılan bir çalışmada 2-69 yaş aralığındaki 77 bireyden yeni çıkarılan tonsil dokularının B, T ve monosit hücrelerinde parvovirüs B19 dağılımı incelendiğinde parvovirüs DNA'sının en çok B hücrelerinde olduğu ve bunların içinde 40 yıl önce dolaşımda kaybolan bir parvovirüs B19 genotipi tespit edilmiştir (Pyörä ve ark. 2017).



Orak hücre anemisi, herediter sferositoz, talasemi ve kazanılmış hemolitik anemi geçici aplastik kriz ile ilişkilendirilmiştir. Eritrositlerin hayatta kalma süresi kısalmış hemoliz ya da kan kaybı kaynaklı yüksek eritrosit döngüsü ve hemogloblin seviyesi sınırda olan hastalarda eritrosit üretiminin kısa süreli kesilmesi kendi kendini sınırlayan, fakat ciddi derin bir anemiye, geçici aplastik krize yol açabilir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda, parvovirüs B19 enfeksiyonu kronikleşebilir saf eritroid aplaziye neden olabilir. Bazı otoimmün hastalıklarda parvovirüs B19 sıklığının daha fazla olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (Kerry 2000, Naides 1993, Naciute ve ark. 2017).

Parvovirüs B19 IgG antikorları hastalığa karşı hayat boyu koruma sağlar ve hastalığı geçiren kişilerde eritema enfeksiyozumun ya da geçici aplastik krizin tekrarı görülmemektedir. Fakat düşük seviyede parvovirüs B19 antikorlara sahip bir hastada, deneysel inokulasyonla asemptomatik bir enfeksiyonun daima reenfeksiyonu önlemeyeceği çalışmalarla gösterilmiştir (Anderson ve ark. 1985, Knipe ve Howley 2013). İmmün yetersizliği olan hastalarda, genel olarak parvovirüs B19 enfeksiyonu kronikleşmektedir. Bu hastalarda, eritrosit aplazisi oluşma olasılığı yüksektir. İmmün cevabın yetersizliği nedeni ile virüse özgü antikorlar yapılamadığından hastalarda persistan bir viremi oluşmaktadır. Kronik HPV B19 enfeksiyonu akut lenfoblastik lösemi, HIV enfeksiyonu, Burkitt lenfoma, Wilm's gibi maligniteler sebebi ile immünsüpressif ilaç tedavisi alan hastalarda bildirilmiştir (Yarkın 1999).

**Talasemi Majör:** İnsan parvovirüs B19'un eritroid progenitor hücrelere tropizmi nedeniyle beta-talasemi majör gibi altta yatan bir hemolitik bozukluğu olan hastalarda enfeksiyon, yaşamı tehdit edebilecek geçici aplazi krizi (Transient Aplastic Crisis, TAC) olarak anılan eritrosit oluşumunun baskılanmasına neden olur. İran'lı Talasemi hastası olan kişilerde insan parvovirus B19 enfeksiyonu üzerine sadece bir epidemiyolojik çalışma bildirilmiş olup, bu çalışmada talasemi major hastaları ile sağlıklı kişiler arasında parvovirus B19 enfeksiyonu prevalansı karşılaştırılmıştır. Aktif B19 enfeksiyonu ve talasemi arasındaki İran ilişkisi hakkında yeterli bilgi eksikliği, talasemi major hastalarında aktif B19 enfeksiyonu oranının belirlenmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu tür yüksek riskli grupların izlenmesi, epidemiyolojik prevalansı ve hastalık önleme tedbirleri için gereklidir. İran'da Erişkin Talasemi Kliniğinde, İran'lı beta talasemi major hastalarında B19 virüsü enfeksiyonu üzerine yapılan moleküler epidemiyolojik bir çalışma bulunmaktadır. Talasemi olan 150 hastanın

6'sında (%4) B19 DNA pozitif olarak belirlenmiştir. Kan nakli sıklığı ile B19 DNA pozitifliği arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir (Arabzadeh ve ark. 2017).

**Eritema infeksiyozum:** İnsan parvovirüsü (HPV) B19, etnik veya coğrafi sınırlar olmaksızın dünya çapında çok yaygın olan bir viral ajandır. HPVB19 ile enfeksiyon, son evre böbrek hastalığı, Eritema İnfeksiyozum (beşinci hastalığı), geçici aplastik kriz, saf kırmızı hücre aplazisi, immün olmayan hidrops fetalis, glomerulopati ve anemi gibi çeşitli klinik belirtilere neden olduğu bilinmektedir (Furukawa ve ark. 2017).

#### 1.5.4. Tanı

Serumda HPV B19 IgM seviyeleri viremiye ait semptomların başlangıcından sonraki ilk üç gün içerisinde belirlenebilir düzeylere ulaşmakta 2-3 haftada en üst düzeye çıkıp, 2-3 ay sürmektedir. Bazen nadir olsa da 6 ay sürebilmektedir. HPV B19 IgM seropozitif hastaların büyük bir kısmında tükrük örneklerinde de tespit edilebilir seviyededir. IgG genellikle üçüncü haftada gelişir yıllarca devam eder ve geçirilmiş enfeksiyonu belirtmektedir.

HPV B19 viral antijen tespiti için ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) veya immünofloresan testi kullanılabilir. Ancak bu testler DNA testleri kadar duyarlı değildirler. HPV B19 DNA'sını tespit için DNA hibridizasyon testi dot blot hibridizasyon *in situ* hibridizasyon ve PZR testi kullanılmaktadır. PZR testi diğer testlere göre doğruluk ve güvenilirliği yüksektir (Al-Abdwani ve ark. 2008).

*Parvoviridae* ailesinde bulunan birçok otonom parvovirüsü saptamak ve miktarını belirlemek için hemagglütinasyon testleri de kullanılabilir. Parvovirüs B19 da Habeş maymunu ve insan orjinli eritrositleri aglütine eder. Parvovirüs B19'un belirgin yönelimi olduğu bilinen P grubu antijenlerle daha önceden kaplanmış eritrositleri kullanılır. Aktif virüs bu antijenlerle çapraz reaksiyona girerek eritrositlerin aglütine olmasına yol açar. Bu yöntem insan serumunda inhibitörlerin bulunmasından dolayı kullanımını uygun görülmemektedir (Yener 2001).

## 2. ONKOVİRÜS KAYNAKLI ÇOCUKLUK KANSERLERİ

Dünya Sağlık Örgütü'nün çocuk sağlığı ve çevre kapsamında vermiş olduğu verilere göre Amerika Birleşik Devletleri'nde 15 yaşın altındaki çocukların ölüm nedenleri arasında ilk sırada yaklaşık %36'lık oran ile kazalar yer alırken, kanserlerin yaklaşık %12'lik oranla ikinci sırada yer aldığı görülmektedir (WHO 2009a, Gallo ve Reitz 2010).

Uluslararası çocukluk çağı kanser sınıflandırmasına göre tümörler aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır:

- 1-Lösemiler, myeloproliferatif hastalıklar ve myelodisplastik hastalıklar,
- 2-Lenfomalar ve retikuloendotelial neoplaziler,
- 3-Merkezi sinir sistemi ve diğer intrakraniyel intraspinal neoplaziler,
- 4-Nöroblastoma ve diğer periferik sinir hücre tümörleri,
- 5-Retinoblastoma,
- 6-Renal tümörler,
- 7-Karaciğer tümörleri,
- 8-Malignant kemik tümörleri,
- 9-Yumuşak doku ve diğer kemik dışı sarkomalar (ekstraosseöz) sarkomalar,
- 10-Üreme hücresi tümörleri, trofoblastik tümörler ve gonad neoplazileri,
- 11-Diğer malign epitelial neoplaziler ve malign melanomalar,
- 12-Diğer belirsiz malign neoplaziler ( Steliarova-Foucher ve ark. 2005).

Bu tez kapsamında incelenen hastalar, uluslararası çocukluk çağı kanser sınıflandırmasındaki sınıf 1 ve 2 grubunda yer almakta olan akut lenfoblastik lösemi (T-cell ve B-cell ALL), Hodgkin lenfoma ve Non-Hodgkin lenfoma hastalarıdır.

## 2.1. Akut Lenfoblastik Lösemi

Çocukluk çağında en sık görülen kanser türü lösemidir. Sanayileşmiş ülkelerde 15 yaşın altındaki çocuklarda tanımlanan kanserlerin % 30'unu oluşturmaktadır (WHO 2009b). 20 yaşın altındaki vakaların ise % 27'sini lösemi oluştururken, lösemide en sık görüleni %73'lük oranla Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) dir (Orkin ve ark. 2009).

Genel olarak tüm lösemi türlerinin insidansı 5 yaş altında yüksektir. Enfeksiyon, radyasyon, kimyasal ilaçlar, çevresel faktörler ve son dönemde beslenmenin de eklendiği bazı faktörler lösemnin gelişmesinde etkili olduğu bildirilmektedir. Çocuklarda lösemi riskinin artmasında bazı zararlı kimyasalların etkili olduğu belirlenmiştir. Bu kimyasallar arasında özellikle benzenin ALL ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Belson ve ark. 2007). Gebelik sırasında veya çocuklukta pestisitlere maruz kalmanın lösemi riskini artırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Rudant ve ark. 2007, Infante-Rivard ve ark. 2007).

Akut lenfoblastik lösemi antijen ekspresyonuna ve kökenine göre üç ana gruba ayrılmaktadır: B-prekürsör, olgun B hücreli ve T hücreli lösemiler. Daha nadir olarak lösemik hücreler lenfoid ve miyeloid yüzey antijenlerini eksprese ederlerse bu durum bifenotipik lösemi olarak tanımlanmaktadır (Orkin ve ark. 2009).

ALL tanısında, periyodik asit-Schiff (PAS) boyama, hiper eozinofili saptanması, miyeloperoksidaz testi ve immünofenotiplendirme sıklıkla kullanılmaktadır. ALL'de hücreler PAS boyamada pozitiflik verirken myeloperoksidaz çoğunlukla negatiftir. Flow sitometri kullanılarak yapılan immünofenotiplendirme ALL tanısında standart bir prosedür haline gelmiştir. Bu yöntemle ayrıca Minimal Rezidüel Hastalık (MRD) belirlenmesi ve izlenmesi yapılmaktadır. MRD ALL tanı sonrasında prognoz indikatörü olarak kullanılan ve tedavi planlamasında önemli olan bir parametredir (Chiaretti ve ark. 2014, Schuurhuis ve ark. 2018). Bu değerlendirmede lösemik hücreler tanı anında belirlenen hedef hücreler kullanılarak yapılır. Bu amaçla flow sitometri kullanılacaksa lösemiye spesifik immünofenotipler kullanılmalıdır.

## 2.2. Akut lösemilerde immünofenotiplendirme

**İmmunolojik sınıflandırma:** T ve B hücrelerde normal gelişim sırasında hücre yüzeylelerinde ve stoplazmada farklı reseptörlerin olduğu görülmektedir. Lösemilerde kanserin hangi gelişim basamağında olduğunun belirlenmesi tedavi ve prognoz açısından önemlidir. Olgun B hücreli ALL'de prognoz kötü iken pre-B hücreli (erken B hücreli ALL) ALL'de daha iyi prognoz gözlenmektedir. İmmunfenotiplendirmede flow sitometri cihazları kullanılmaktadır. Flow sitometri bulgularına göre ALL 4 grupta değerlendirilmektedir: B-prekürsör hücreli, olgun B hücreli, T hücreli ve bifenotipik ALL olarak sınıflandırılmaktadır (Silverman ve ark. 2009).

**Prekürsör B-hücreli ALL:** Çocukluk çağı ALL vakalarının %80-85'i bu grupta yer almaktadır. Bu gruptaki hücreler çoğunlukla CD19, CD22, CD79a gibi hastalığa spesifik markerleri eksprese ederler. Özellikle %80-90 oranında CD10 (Comon leukocyte antigen-CALLA) eksprese ettikleri görülmektedir (Erkut ve Aydoğdu 2007).

**Olgun B-hücreli ALL:** Genellikle çocukluk çağı ALL vakalarının %1-2'sinde görülmektedir. Olgun B hücre belirteci olan yüzey immunglobulini (kapa ve lambda zincirlerini içeren monoklonal antikorlar) pozitif olması ile ayırıcı tanıyı almaktadır. CD19, CD20, HLA-DR gibi diğer B hücre belirteçlerini taşıyabilirler (Erkut ve Aydoğdu 2007).

**T-hücreli ALL:** Çocukluk çağı ALL vakalarının %10-15'i bu gruptadır. Genellikle daha büyük çocuklar bu grupta yer almaktadır. T-hücreli ALL'de genelde sitoplazmik CD3, TdT, CD2, CD5, CD7, CD4, CD8 pozitifliği görülmektedir (Erkut ve Aydoğdu 2007).

**Bifenotipik (Mixed-lineage) lösemi:** Diğer üç gruptan farklı olarak lenfoid ve myeloid antijenleri aynı anda eksprese eden miks lösemi tipidir. Diğer grupların eksprese ettikleri markerları eksprese edebilirler. Sitogenetik ve kromozomal analiz ayırıcı tanıda önemlidir (Erkut ve Aydoğdu 2007).

### 2.3. Lenfoma

Uluslararası çocukluk çağı kanser sınıflandırmasına göre lenfomalar iki ana gruba ayrılır: Hodgkin lenfomalar ve Non-Hodgkin lenfomalar (Steliarova-Foucher ve ark. 2005). Türk Pediatrik Onkoloji Grubu pediatrik tümör kayıtlarına göre ülkemizde çocuklarda lenfoma görülme oranı %26.8 dir. Bunların yaklaşık %17'si Non-hodgkin lenfoma iken yaklaşık %10'u Hodgkin lenfomadır (Kutluk 2006).

HL ve NHL etiolojisinde pek çok faktör etkilidir. Bu faktörler arasında immün yetmezlik, genetik faktörler, çevresel etkenler, perinatal faktörler (doğum ağırlığı, annenin yaşlı olması gibi) ve EBV enfeksiyonu yer almaktadır (Crump ve ark. 2012).

EBV enfeksiyonları ile HL arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda epidemiyolojik ve serolojik çalışmalar yapılmıştır. HL hastalarda serumda yüksek anti-EBV antikor titreleri EBV'nin HL'sına öncülük edebileceğini düşündürmüştür. Reed-Sternberg hücrelerinde EBV viral genomunun varlığının gösterilmesi bu hipotezin direkt kanıtı olmuştur. Tanıda EBV pozitif olan HL vakalarında saptanan EBV suşunun, relaps olan hastalarda da saptandığı görülmüştür (Brouset ve ark. 1994).

Klasik hodgkin lenfomada belirleyici hücre tipi Reed-Sternberg hücreleridir. Bu hücreler tümör dokusunun sadece %1-2'lik bölümünü oluşturmaktadır. Tümör dokusunda daha çok lenfositler, eozinofiller, fibroblast, makrofajlar ve plazma hücrelerinden oluşan miks inflamatuvar hücreler yer almaktadır. Hodgkin lenfomanın immünohistokimyasal bulguları Tablo-17 verilmiştir. Flow sitometri HL tanısında kullanılmamaktadır çünkü reed-strenberg hücreleri az sayıdadır ve flow sitometri analiz için çok büyük hücrelerdir. Ancak biyopsilerde ayırimsal tanıda kullanılabilir (Weinstein ve ark. 2007).

**Çizelge 2.1** Hodgkin lenfoma ayırimsal tanısında kullanılan immünohistokimya markerları (Weinstein ve ark.2007)(++: HL hücrelerinde pozitif olan, +/- : HL hücrelerinde pozitif ve negatif olabilen, -/+ : HL hücrelerinde negatif olan zayıf pozitiflik verebilen, -/- : HL hücrelerinde negatif beklenen, - : HL hücrelerinde ekspresyona olmayan markerlar).

	Hodgkin lenfoma
CD30	++
CD15	+/-
CD20	-/+
CD79	-/+
J-Chain	-
BSAP	+/-
BOB1	-/+
OCT.2	-/+
MUM.1	+/+
BCL-6	-

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma hastanesinde lösemi ve lenfoma tanısı kesinleşen hasta gruplarından tedavi öncesi ve tedavi sonrası (33. gün) kan örneklerinde EBV, KSHV, Parvovirüs B19 ve HTLV-1 etkenlerinin var olup olmadığının araştırılmasını amaçlamaktadır.

Bu tez, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi 21.03.2016 tarihli ve 2016-011 karar sayılı klinik araştırmalar etik kurul izni ile yapıldı.

#### 3.1. Tez Kapsamına Alınan Hasta Grupları

Hastalara yapılacak işlemler sözlü olarak anlatıldıktan sonra, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Araştırmalara Katılım İçin Aydınlatılmış Gönüllü Onam Formu'nu okumaları ve kabul ettikleri takdirde imzalamaları istendi. Hastalar çocuk yaş grubunda oldukları için veli/vasisinin onamı alındı. Tez çalışmasına, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesine 2010-2017 tarihleri arasında, ciltte solukluk, ateş, kusma aşırı yorgunluk hissi, iştahsızlık aşırı kilo kaybı gibi şikayetlerle hematoloji polikliniğine başvuran 2-16 yaş arası çocuk hastalar alınmış ve tanı amacı ile alınan kan örneklerinden lösemi ve lenfoma tanısı kesinleşen hastalar dahil edildi.

Teze, 9 hasta B cell lenfoma, 6 hasta T cell lenfoma, 8 hasta Hodgkin lenfoma, 10 hasta lösemi ve lenfoma hastalığından relaps olan gruplardan; olmak üzere toplam 33 hasta alındı. Aynı hasta grupları için Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi onkoloji servisinde yeni tanı konan ve immünsüpresyon tedavisine başlandıktan sonraki 33. gün örnekleri de izole edilerek tez çalışmasına dahil edilmesi ile toplam 65 adet tam kan örneği tez kapsamına alındı.



Kemik iliğinde blastik hücre sayısı %5'i geçtiğinde veya periferde blastik hücre saptandığında lösemiden şüphe edilmekle birlikte akut lösemide kemik iliği genellikle blastik hücrelerle tamamen dolmuş durumdadır. Wright-Giemza ile boyanan lenfoblastlar düzgün, homojen, çekirdekleri ayırt edilemeyen nükleer materyal mevcuttur.

Histokimyasal sınıflama için birçok farklı boya kullanılmaktadır. ALL vakalarının yaklaşık olarak %80'inde lenfoblastlar periodic acid-Schiff (PAS) ile reaksiyon verir ve stoplazmik glikojen boyanmaktadır. Miyeloperoksidaz ve Sudan black boyaları ALL'de genellikle negatiftir, myeloblastları boyamaktadır. Bu tez çalışmasına PAS ile boyanıp ALL pozitif kabul edilen hasta grupları alındı.

### **3.1.1. Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama**

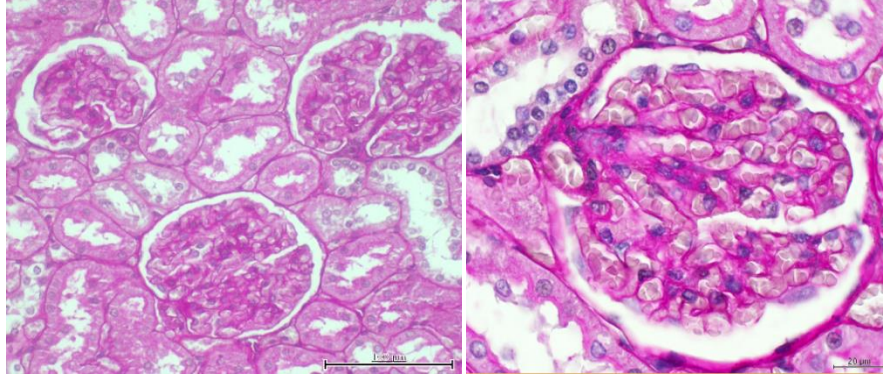
PAS boyası periyodik asit ve schiff solüsyonunun birlikte hazırlanması ile oluşturulur. Periyodik asit solusyonu; 1 gr periyodik asit ve 200 ml distile su ile hazırlandı.

### **3.1.2. Schiff Boyama**

200 ml distile su kaynatıldı, 1 gr bazik fuksin eklendi ve solusyon 50 °C'ye kadar soğutuldu, sonrasında 2 gr potasyum metabisülfid eklenip karıştırıldı. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve 2 ml HCl eklenip iyice karıştırıldıktan sonra tekrar 2 gr aktif karbon eklendi. Bir gece oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Ertesi gün filitre kağıdı ile filitrelenip kullanıma hazır hale getirildi.

Boyama; Ksilende deparafinize olan dokular alkol serilerinden geçirilerek (%100, %96, %75) suda yıkandı. Periyodik asit (5-10 dk), akar suda yıkama, Schiff'in solüsyonu (15-20 dk), akar suda yıkama (5-10 dk), Hematoxylen, Alkol serileri (%75, %96, %100), Ksilol ve kapatma işleminden sonra preparat hazır hale getirildi. Asit-Schiff boyası ile boyanan böbrek tümörlü ve hodgkin lenfomalı hastanın böbrek kesit görüntüsü ve etken olan Reed-Sternberg

hücre görüntüsü mikroskop ile görüntülendi (Olympus CX31-CKX41). Kesitler **Şekil 3.1**'de gösterildiği gibidir.



**Şekil 3.1.** Pas Schiff boyası ile boyanmış insan böbrek kesitleri (Kesit görüntüleri Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi patoloji laboratuvarına aittir.) (Olympus CKX 41,Almanya, 10×,40× büyütme görüntüleridir).

### **3.2. B ve T hücrelerin Flow Sitometrik Analizleri ve Boyamalar**

Akut lenfoblastik Lösemi maturasyon ve kökene sahip spesifik antijen ekspresyonuna göre B-öncül, olgun B-hücreli ve T hücreli olmak üzere 3 gruba ayrılır. Gruplandırma hücrelerin eksprese ettikleri yüzey antijen markerlarına göre belirlenerek, kaluza programı ile Flow sitometri (BD biosciences, Almanya) cihazı ile B-hücreli ve T-hücreli hastaların görüntüleri gösterildi. **Şekil 3.2**'de T-ALL pozitif olan hastanın eksprese ettiği ve **Şekil 3.3**'de ise B-ALL pozitif grafikleri göstermektedir.

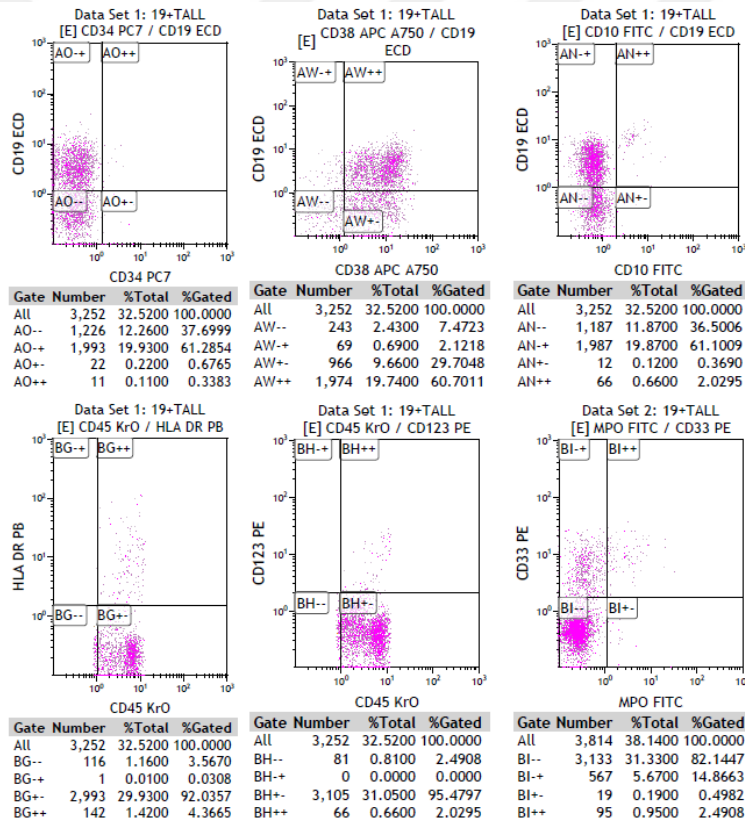
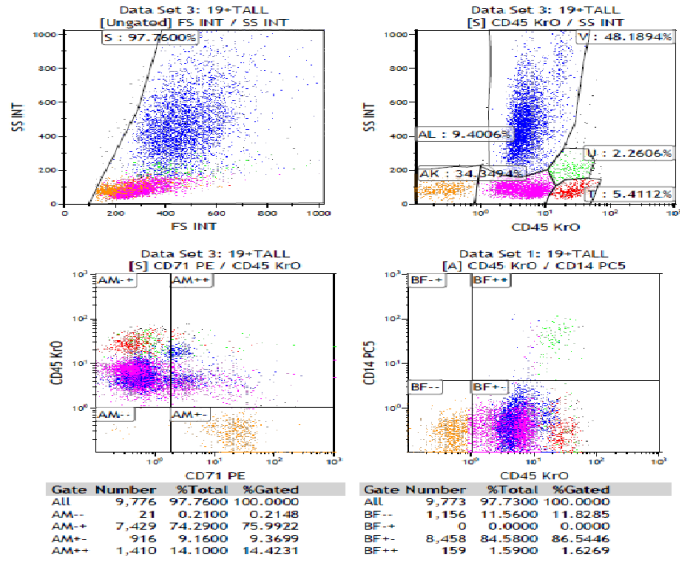
İzole edilen T ve B hücre popülasyonlarının sayımı hemogram cihazıyla (Beckman Coulter, Almanya) yapıldı ve karakteristik özelliklerini belirlemek amacıyla flow sitometride immunfenotiplendirme yapıldı. Hücre yüzeyinde eksprese olan antijen moleküllerine spesifik antikolar kullanılarak tanımlama yapılmaktadır. Antikor aracılığı ile antijeni göstermek için kullanılan florokromlar ışığı absorbe ederek farklı dalga boylarında ışın saçarlar. T hücreler için kullanılan konjuge antikolar (Beckman Coulter, CA, ABD) ve konjuge florokromları: TDT-FITC (Fluorescein isothiocyanate), CD3-PB (Pacific Blue), CD2-APC (Allofikosiyenin), CD45-Kro (Krome Orange), CD38-APC, HLADR-PB, CD15-PC5 (Fikoeritrin siyanin5), CD14-PC5, CD71-PE, CD123-PE. B hücreler için kullanılan konjuge

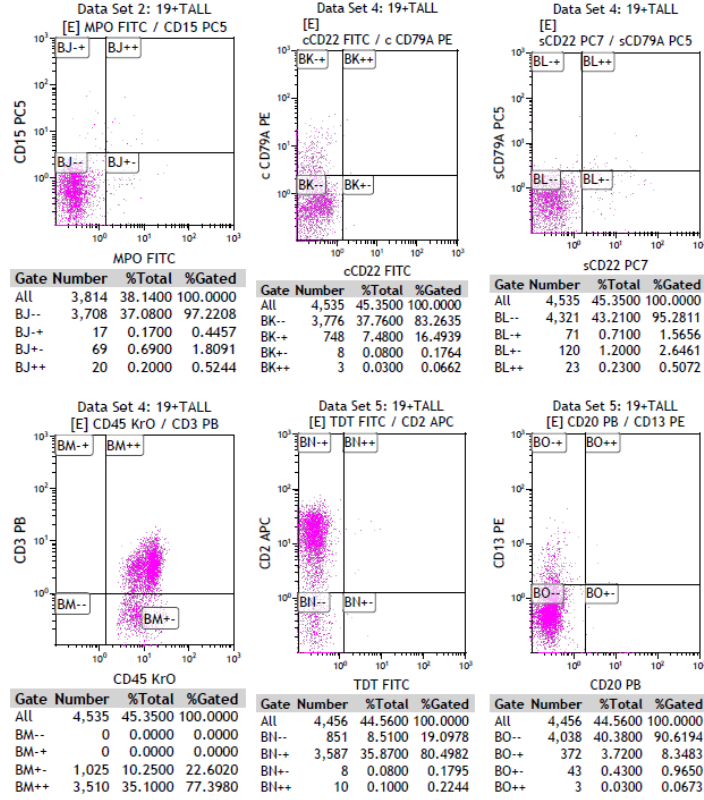
antikorlar: CD7-ECD (Fikoeritrin-Teksas KırmızıS1-x), CD19-PE, CD10-ECD, CD20-PC7, CD38-PC7 (Fikoeritrin siyanin7), CD5-PC5, CD34-FITC.

**Yüzey boyama:** Yüzey boyama işlemi Beckman Coulter kitleri ile gerçekleştirildi. 100 µl periferik kan örneği alındı, 10µl yüzey antikoruna eklendi ve vorteksledi. Sonrasında 15 dakika oda ısısında inkübe ettikten sonra 500 µl Lizis (OptiLyse-A11895) solüsyonu eklendi ve vorteks işlemi tekrar edildi. Örnekler 10 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra, 500 µl PBS eklendi ve tekrar vorteksledi. Örnekler 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, 1500 rpm'de santrifüj (NF200, Nüve, Türkiye) edildi, süpernatant atıldı ve 500 µl PBS (100ml distile su 0.14 M NaCl,0.0027 KCl 0.01 Phosphat buffer Ph:7,4) eklendi ve sonrasında analizler gerçekleştirildi.

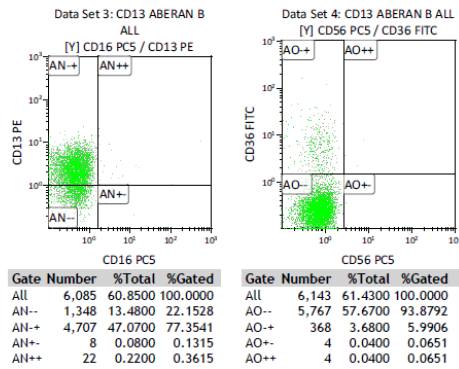
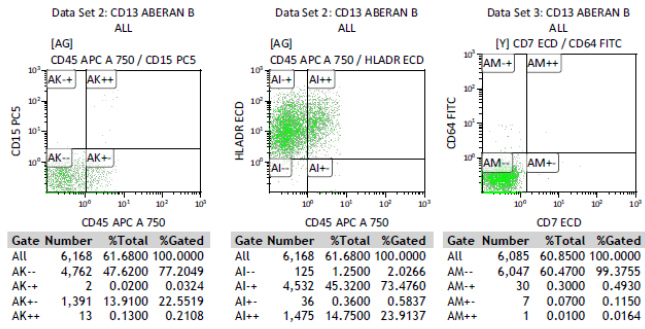
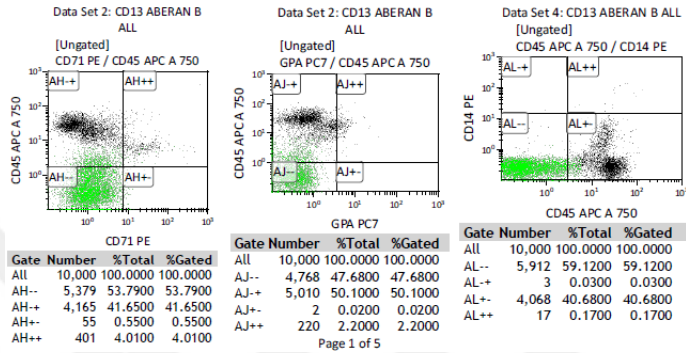
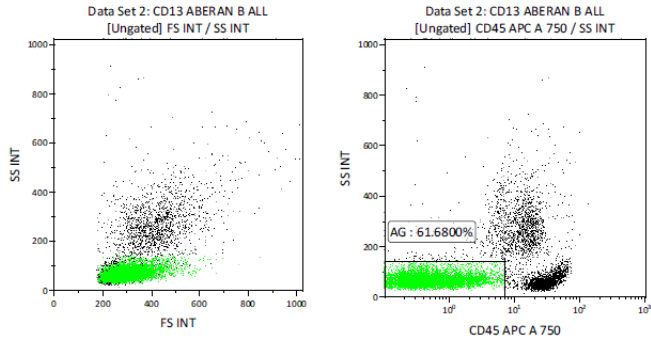
**Hücre içi boyama:** Hücre boyama işlemi Beckman Coulter kitleri ile yapıldı. İşlem kısaca aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi. 100 µl periferik kan örneği alındı, 10µl yüzey antikoruna eklendi ve vorteks işlemi gerçekleştirildi. Örnekler 15 dakika oda ısısında inkübe edildi ve 100 µl reaktif 1 (IntraPrep Permeabilization Reagent 1-A07803) solüsyonu ilave edildikten sonra vorteksledi. Örnekler 10 dakika oda ısısında karanlık ortamda inkübe edildi ve 2 ml PBS eklendi. PBS ilavesini takiben 5 dakika 1500 rpm santrifüj yapıldı, süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra, pelletin üzerine 100 µl reaktif 2 (IntraPrep Permeabilization Reagent 2-A07803) eklendi ve vorteks tekrar edildi. Hücre içi boyama için 10 µl antikor ilave edildi ve tekrar vortek işlemi gerçekleştirildi. Örnekler boyamanın gerçekleşmesi için 15 dakika oda ısısında inkübe edildi ve 1500 rpm santrifüj yapıldı. Dipte kalan pelete 500 µl PBS eklendi ve analizler gerçekleştirildi.

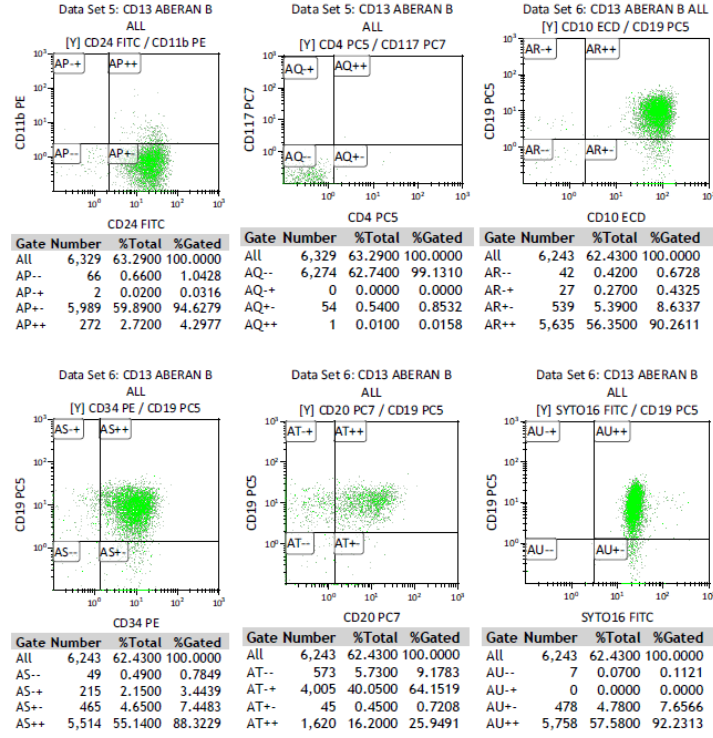
Süspansiyon halindeki canlı hücre popülasyonunda grafik bir çerçeveye ile kapılama işlemi yapıldı. FSC/SSC ve CD45 grafiğinde T ve B hücrelerinin düştüğü yerler belirlendi ve flow sitometride okuma ve analizler gerçekleştirildi.





**Şekil 3.2.**T-cell ALL flow sitometri görüntüsü CD14(-), CD45(+), CD71(+), GPA(-), MPO(-), HLA-DR(+), CD38(-), CD2(+), CD15(-) (Ankara çocuk sağlığı ve hastalıkları hematoloji onkoloji eğitim ve araştırma hastanesi flow sitometri laboratuvarı, BD biosciences, Almanya).





**Şekil 3.3.** B-cell ALL Flow sitometri görüntüsü. CD15(-), CD19(+), CD45(+), CD10(+), CD34(+), CD38(+), CDCD7(-), CD20(+), CD5(-) (Ankara çocuk sağlığı ve hastalıkları hematoloji onkoloji eğitim ve araştırma hastanesi flow sitometri laboratuvarı, BD biosciences, Almanya).

Merkezimizde çocuk yaştaki ALL hastalarının tedavisinde TÜRK ALL-BFM (Berlin-Franfurt-Munih) 2000 kemoterapi protokolü kullanıldı (Orkin ve ark. 2009). Bu protokolde ilk bir hafta sadece steroid tedavisi verilmekte ve tedavinin 8. gününde steroid tedavisine yanıtın değerlendirilmesi amacı ile periferik kanda mutlak blast sayısına bakıldı. Kemoterapi protokolünün 1. haftasından itibaren vinkristin, L-asparaginaz, daunorubisin ve intraketal metotreksat da tedaviye eklendi. İndüksiyon tedavisi 33. günde tamamlandı. İndüksiyon tedavisi bitiminde 33. günde hasta kemik iliği aspirasyonu ile değerlendirildi. Yapılan bu tezde tedavinin başlamadan önceki örneği 0. gün ve tedavi bitimindeki örneği 33. gün olarak alınıp teze dahil edildi.

Tez kapsamına alınan hasta grupları ve tanıları aşağıdaki **Çizelge 3.1**'de gösterildiği şekildedir. Tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere 65 tam kan örneğinden viral etkenler araştırıldı.

**Çizelge 3.1.** Tez kapsamında incelenen hastalar, tanıları ve alınan örneklerin niteliği

ÖRNEK NO	HASTA İSİM	TANI	ALINAN ÖRNEK
1	K.Ü	T CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
2	A.S	T CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
3	S.İ	T CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
4	E.G	T CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
5	F.C.K	T CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
6	E.C.D	T CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
7	K.Ü	T CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
8	A.S	T CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
9	S.İ	T CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
10	E.G	T CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
11	F.C.K	T CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
12	E.C.D	T CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
13	B.D	T CELL ALL	KONTROL
14	T.C	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
15	A.K	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
16	Ö.F.B	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
17	M.E.Ç	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
18	Ö.N.T	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
19	K.A.B	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
20	E.G	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
21	A.A	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
22	Ü.A	B CELL ALL	TEDAVİ ÖNCESİ
23	T.C	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
24	A.K	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
25	Ö.F.B	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
26	M.E.Ç	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
27	Ö.N.T	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
28	K.A.B	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
29	E.G	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
30	A.A	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
31	Ü.A	B CELL ALL	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
32	B.B	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
33	A.İ.D	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
34	C.A	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
35	H.E.Y	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
36	A.Ç	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
37	N.A	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
38	B.C	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
39	M.M.B	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
40	B.B	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
41	A.İ.D	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
42	C.A	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
43	H.E.Y	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
44	A.Ç	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
45	N.A	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
46	B.C	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
47	M.M.B	HODGKIN LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
48	C.K	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
49	Y.A	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
50	N.Ş	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
51	M.S	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
52	O.A.S	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
53	D.M.D	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
54	E.C.D	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
55	M.R.A	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
56	E.A	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ ÖNCESİ
57	C.K	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
58	Y.A	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
59	N.Ş	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
60	M.S	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
61	O.A.S	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
62	D.M.D	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
63	E.C.D	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
64	M.R.A	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN
65	E.A	RELAPS LÖSEMİ,LENFOMA	TEDAVİ SONRASI 33.GÜN



### 3.3. Örneklerin izolasyonu ve saklanması

Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesine; solukluk, ateş, kusma vb. şikayetlerle hematoloji polikliniğine başvuran ve tanı amacı ile alınan periferik kan örneklerinden ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi), H.L (Hodgkin Lenfoma), Nonhodgkin Lenfoma (N.H.L), Aplastik Anemi (A.A) gibi hastalıklarda tanısı kesinleşen hastalardan, hasta veya 18 yaş üstü hasta yakını onamı alınarak hastadan 1 adet DNA izole etmek için EDTA'lı tüp örneği alındı. Hastaların tedavi sürecini takiben kemoterapi bitimi 33. gün örnekleri de tedavi öncesinde olduğu gibi izolasyon amacı ile saklandı.

### 3.4. DNA İzolasyonu

İzole edilen örneklerden DNA izolasyon işlemi PureLink Genomic DNA Mini Kit (K182002, Invitrogen, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak yapıldı. Bunun için kısaca, tam kan örneğinden 200 µl, 20 µl proteinaz K ve 20 µl RNaz A santrifüj tüpüne alındı. Karışım hafifçe vortekslendi (V1 plus, Boeco, Almanya) ve oda ısısında 2 dakika bekletildi. Ardından karışıma 200 µl lizis solüsyonu ilave edildikten sonra vortekslendi ve tüpler 55°C'de 10 dakika su banyosunda (BM15, Nüve, Türkiye) bekletildi. Örneklere 200 µl %100 etanolden ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan lizat pürifikasyon kolonuna transfer edildi. Tüpler 1 dakika 10,000×g'de santrifüj (5417R, Eppendorf, Hamburg, Almanya) edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonun içine 500 µl yıkama solüsyonu 1' den ilave edildi ve 1 dakika 10,000 ×g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonun içine 500 µl yıkama solüsyonu 2'den ilave edildi. 3 dk 13,000×g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü uzaklaştırıldı. Kolon steril 1.5 ml santrifüj tüpüne yerleştirildi. 200 µl elüsyon buffer kolona ilave edildi ve 1-2 dk oda ısısında bekletildi. Sonrasında 1 dk 10,000×g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpte toplanan DNA örnekleri daha sonraki PZR analizleri için -20°C derin dondurucuda saklandı. Gerekli olduğu durumlarda DNA izolasyonu için GeneJET genomik

DNA pürifikasyon kiti (K0722, Thermo Scientific, Massachusetts, Amerika Birleşik Devletleri) de üreticinin belirttiği şekilde kullanıldı.

### 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu tezde araştırılan virüslerin hedef genlerini çoğaltmak için kullanılan primer çiftleri çizelge-3'de belirtildi. Örnekler, housekeeping gen olarak GAPDH primerleri (Çizelge 3.2) kullanılarak amplifiye edildi. Tüm viral etkenler için PZR karışımı ve kondisyonları optimize edildi. Bunun için 5 µl DNA örneği alınıp, 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP, 5X PZR buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq DNA polimeraz kullanılarak karışım toplam 50 µl olarak hazırlandı. PZR siklus kondisyonu 95°C'de 2 dakika denatürasyon, 32 siklus: 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 10 dakika son uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

Bu tezde kullanılan primerler ve ilgili virüslerin hedef genlerini çoğaltmak için literatürde belirtilen primerler aşağıdaki tablodaki gibidir.

**Çizelge 3.2.** Tezde araştırılan virüslerin hedeflenen genleri ve spesifik primer sekansları. (F; Forward, R; Reverse)

	Primer sekansı	Gen	Ürün (bp)	Kaynak
Kaposi sarkoma virüs	F: 5'-GGTGTATGTTCTGAGTACATAGCGG-3' R: 5'-CCGAGGACGAAATGGAAGTG-3'	ORF73	143 bç	Lallemand ve ark. 2000
Epstein-Barr virüsü primer-1	F: 5'-TGGAGCCTGACCTGTGATCGT-3' R: 5'-TAGGCCATTTCCAGGTCCTGTA-3'	EBNA1	293 bç	Kubota ve ark. 2008
Epstein-Barr virüsü primer-2	F: 5'-AGAAGGGGAGCGTGTGTTGT-3' R: 5'-GGCTCGTTTTTGACGTCGGC-3'	EBNA3C	153 bç (EBV tip1) 246 bç (EBV tip2)	Tamer 2006, Jin ve ark. 2010
Epstein-Barr virüsü primer-3	F: 5'-CCTTAGGAGGAACAAGTCCC-3' R: 5'-GGCTGGTGTACCTGTGTTA-3'	Gp220	239 bç	Telenti ve ark. 1990
İnsan parvovirüs B19	F: 5'-CCACTATGAAAAGTGGGCAATA-3' R: 5'-GCTGCTTTCAGTGTCTTCA-3'	NS1	154 bç	Toppinen ve ark. 2015

HTLV-1	F: 5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3' R: 5'-TGGAGTAACTTACTAGGTTAG-3'	Pol	668 bç	Mahzounieh ve ark. 2015
İnsan GAPDH	F: 5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3' R: 5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'	GAPDH	204 bç	Ito ve ark.2007

Polimeraz zincir reaksiyonu için 5 µl DNA örneği alınıp, 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP, 5X PZR buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq DNA polimeraz kullanılarak karışım toplam 50 µl olarak hazırlandı. PZR optimizasyonunda siklus sayısı annealing gibi değerler optimize edildi.

HTLV-1 tanısı için Pol gen bölgesi hedef alındı. Tez çalışmasında araştırılan virüslerin hedef genlerini çoğaltmak için Forward ve reverse primer çiftleri kullanıldı, hedef ürün büyüklüğü 668 bp olarak belirlendi. PZR karışımı için 5 µl DNA örneği alınıp, 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP, 5X PZR buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq DNA polimeraz kullanılarak karışım toplam 50 µl olarak hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C'de 2 dakika, 36 siklus 95°C'de 20 saniye, 58°C'de 20 saniye, 72°C'de 20 saniye ve 72°C'de 10 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

Epstein-Barr (EBV) için 3 farklı primer kullanıldı. EBV primer-1, EBNA-1 gen bölgesini çoğaltmak için kullanıldı ve hedef gen ürün büyüklüğü 293 bp olarak belirlendi. Bunun için 5 µl DNA örneği alınıp, 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP, 5X PZR buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq DNA polimeraz kullanılarak karışım toplam 50 µl olarak hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C'de 2 dakika, 40 siklus 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 10 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

EBV primer-2, EBNA3C gen bölgesini çoğaltmak için kullanıldı ve bu primer için optimizasyon yapıldı. EBV primer-2 ile çoğaltılan ürünler EBV tip 1 için 153 bç, EBV tip 2 için ise 246 bç olarak hesaplandı. Bunun için 5 µl DNA örneği alınıp, 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP, 5X PZR buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq DNA polimeraz kullanılarak karışım toplam 50 µl olarak hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C'de 3 dakika, 40 siklus 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 5 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

EBV primer-3, gp220 gen bölgesini çoğaltmak için kullanıldı ve bu primer için optimizasyon yapıldı. EBV primer-3 ile çoğaltılan ürünler 239 bp olarak hesaplandı. Bunun için 5 µl DNA örneği alınıp, 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP, 5X PZR buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq DNA polimeraz kullanılarak karışım toplam 50 µl olarak hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C'de 3 dakika, 40 siklus 95°C'de 20 saniye, 59°C'de 20 saniye, 72°C'de 20 saniye ve 72°C'de 5 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

Kaposi'sarkoma (HHV-8) ORF73 gen bölgesi hedef alındı. Bu tez çalışmasında araştırılan virüslerin hedef genlerini çoğaltmak için Forward ve reverse primer çiftleri kullanıldı ürün büyüklüğü 143 bp olarak belirlendi. 5 µl DNA örneği alınıp, 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP, 5X PZR buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq DNA polimeraz kullanılarak karışım toplam 50 µl olarak hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C'de 3 dakika, 40 siklus 95°C'de 30 saniye, 54°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 5 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

İnsan Parvovirüs B19 için, NS1 gen bölgesi hedef alındı. Bu tezde araştırılan virüslerin hedef genlerini çoğaltmak Forward ve reverse primer çiftleri kullanılmıştır hedef ürün büyüklüğü 154 bp olarak belirlendi. 5 µl DNA örneği alınıp, 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP, 5X PZR buffer, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq DNA polimeraz kullanılarak karışım toplam 50 µl olarak hazırlandı. PZR siklus kondüsyonu 95°C'de 2 dakika, 35 siklus 95°C'de 30 saniye, 53°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 10 dakika ilave uzama basamağı şeklinde gerçekleştirildi.

### **3.6. Çoğaltılan PZR Ürünlerinin Jel Elektrofrez ve Görüntüleme**

Agaroz jel hazırlanırken tris base'den (Sigma) 121 g alınarak 28.55 ml asetik asit (Merck) içerisine konuldu. Üzerine 0.5M pH 8.0 EDTA çözeltisinden 50 ml ilave edildi. Sonrasında 400 ml distile su (dH<sub>2</sub>O) eklenerek 50X TAE hazırlandı. Agaroz jel hazırlanması sırasında 1X olacak şekilde seyreltildi. PZR ürününü görüntülemek için % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanması sırasında 1 g agaroz (443666A, VWR, Pensilvanya, Amerika Birleşik Devletleri), hassas terazide (BLC-500, Boeco, Almanya) tartıldı. Bir erlenmayer

içerisinde 100 ml 1X TAE ile çözdürüldü. Çözünmenin hızlı gerçekleşmesi için mikrodalga fırın (MD 554 intellowave, Arçelik, Türkiye) kullanıldı. Agarozun ısısı yaklaşık 50°C ye düştükten sonra eriyiğe 0.5 µg/ml oranında ethidium bromide (Vivantis) ilave edilerek soğutuldu. Çoğaltılan RT-PZR ve PZR örnekleri 6X yükleme tamponu (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ile jele yüklendi. Elektroforez işlemi, elektroforez tankı (Sub-Cell GT, Biorad, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri) ve güç kaynağı (MP-250 V, Cleaver Scientific, Warwickshire, İngiltere) kullanılarak 125 volt (V) akımda 50 dakikada gerçekleştirildi. Agaroz jelde UV ışık kaynağı (Illuminix, Nyxtechnic, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak PZR ürünlerine ait hedef bantlar görüntüledi (Azkur ve ark. 2013).

### 3.7. Real-time PZR

Real-time PZR, 5 µl DNA, 10 µl 2X SYBR Green master mix, 0.5pmol forward ve revers primerler ve su karışımı toplam 20 µl olacak şekilde kuruldu. Reaksiyonlar kurulduktan sonra pleytler S2096 rotoru kullanılarak santrifüj (Allegra X-30R, Beckman Coulter, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri) edildi. Reaksiyonlar LightCycler 96 (Roche, Mannheim, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Her bir viral etken için optimize edilen reaksiyon koşulları **Çizelge 3.3'**de verildi. Tüm reaksiyonlarda toplam 38 siklus amplifikasyon yapıldı. Amplifikasyon sonrasında LightCycler 96 software 1.1 kullanılarak örneklerin Cq değerleri, amplifikasyon eğrileri ve erime sıcaklık analizleri (melting curve analyze) değerlendirildi. Real-time PZR analizleri sonucunda elde edilen tüm ürünler %1.5 agaroz jele yüklenerek teyit amaçlı olarak görüntüledi.

**Çizelge 3.3.** Viral etkenlerin real-time PZR için optimize edilen reaksiyon koşulları. (\*, EBV primer-1; \*\*, EBV primer-2; \*\*\*, EBV primer-3 için kullanılan protokollerdir)

Virüs	Preinkübasyon	3-basamaklı amplifikasyon	Erime (melting)
KSHV	95°C 10 dk	95°C 10 s, 54°C 10 s, 72°C 10 s	95°C 10 s, 65°C 60 s, 97°C 1 s
Parvovirüs B19	95°C 10 dk	95°C 10 s, 53°C 10 s, 72°C 10 s	95°C 10 s, 65°C 60 s, 97°C 1 s
EBV <sup>*,**</sup>	95°C 10 dk	95°C 10 s, 53°C 10 s, 72°C 10 s	95°C 10 s, 65°C 60 s, 97°C 1 s
EBV <sup>***</sup>	95°C 10 dk	95°C 10 s, 59°C 10 s, 72°C 10 s	95°C 10 s, 65°C 60 s, 97°C 1 s
HTLV	95°C 10 dk	95°C 10 s, 54°C 10 s, 72°C 10 s	95°C 10 s, 65°C 60 s, 97°C 1 s

### 3.8. Klonlama

EBV gp220 geni TA Cloning kit (K2040, Invitrogen, Kaliforniya, ABD) kullanılarak klonlandı. Öncelikle taze PZR ürünleri EBV primer-3 ile Taq polimeraz kullanılarak amplifiye edildi. PZR ürünlerinin ligasyonu pCR2.1 klonlama vektörü içine ligaz enzimi aracılığıyla yapıldı. Bunun için 2 µl taze PZR ürünü, 2 µl 5X T4 DNA Ligase Reaction Buffer, 2 µl pCR 2.1 vektörü, 1 µl ExpressLink T4 DNA Ligaz ve 3 µl distile su ile reaksiyon kuruldu ve 15 dakika oda ısısında bekletildi.

Ligasyonu tamamlanan vektör kompetent *E.coli* içerisine transforme edildi. Bunun için her ligasyon reaksiyonundan 2µl alınıp kompetent hücre viyaline aktarıldı hafifçe çalkalandı. Viyaller 30 dakika boyunca buz içinde bekletildi. Ardından viyaller 30 saniye boyunca çalkalama olmaksızın 42°C su banyosunda tutuldu ve peşinden hemen buz içine konuldu. Her viyalin içine 250 µl S.O.C. medyumdan ilave edildi. Viyaller 1 saat boyunca 225 rpm hızda çalkalanarak 37°C’de inkübe edildi. Her viyalden 200 µl alınarak 100 µg/ml ampisilin içeren LB agara ekim yapıldı. Agarlar 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

Miniprep öncesinde kolonilerin EBV gp220 genini taşıyıp taşımadığını belirlemek için PZR tarama deneyleri yapıldı. Ampisilinli katı besiyerinde üreyen kolonilerin istenilen rekombinant plazmidler olup olmadığını belirlemek için öncelikle kolonilere steril kürdan değiştirilip, koloniler numaralandırılmış başka bir ampisilinli katı besiyerine ekildi. Daha önceden hazırlanan 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 10X PZR buffer, 3 µl 1,25 mM dNTP, 4 µl 10 pmol/µl M genine özgü primerler ve 4 µl dH<sub>2</sub>O içeren karışıma besiyerindeki koloni kürdan vasıtasıyla ilave edilip 95°C’de 10 dakika tutuldu. Buradan mikrosantrifüj tüpleri kısa süreli santrifüj edildikten sonra içerisinde 0,3 IU Taq polimeraz bulunan 5 µl dH<sub>2</sub>O eklendi. Tüpler 95°C’de 5 dakika, 94°C’de 1 dakika, 59°C’de 1 dakika, 72°C’de 1 dakika 25 siklus PZR tarama uygulandı. PZR ürünleri % 1,5’lik agaroz jelde yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntüledi. PZR tarama sonuçlarına göre rekombinant plazmidleri içerdiği belirlenen kolonilerden plazmid DNA’ları plasmid izolasyon kiti kullanılarak izole edildi (Azkur ve ark. 2003, Tonbak ve ark. 2003).

### 3.9. Plasmid İzolasyonu

EBV gp220 geni klonlanmış olan *E.coli* bakteri LB sıvı besi yerine ekildi ve çalkalamalı inkübatörde (Edmund Buhler, Almanya) gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün PureLink HiPure Plasmid Midiprep kit (K210005, Invitrogen, Kaliforniya, ABD) kullanılarak plasmid DNA'sı izole edildi. Bunun için ilk olarak kolon 10 ml equilibration buffer ile muamele edildi. LB besi yerinde üretilen bakteriler 4,000 ×g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet, RNaz A içeren 4 ml resuspension buffer ile süspansiyon edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra 5 dk oda ısısında bekletildi. Karışıma 4 ml precipitation buffer ilave edildi ve karıştırıldı. Örnekler 12,000 ×g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak kolona aktarıldı ve kolondan yerçekiminin etkisiyle tamamen geçmesi için beklendi. Kolon iki defa 10 ml wash buffer ile yıkandı. Kolonun altına 15 ml steril tüp yerleştirildi ve kolona 5 ml elution buffer ilave edildi. Solüsyonun tüpe geçmesi için beklendi. Kolondan tüpe geçen DNA'nın presipitasyonu için tüpe 3.5 ml izopropanol ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tüpler 12,000 ×g'de 30 dk 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 3 ml %70'lik etanol pellete ilave edildi. Tüp 12,000×g'de 5 dk 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 10 dk oda ısısında kurumaya bırakıldı. Elde edilen plasmid DNA'sı 200 µl TE buffer ile süspansiyon edildi ve -20°C'de muhafaza edildi.

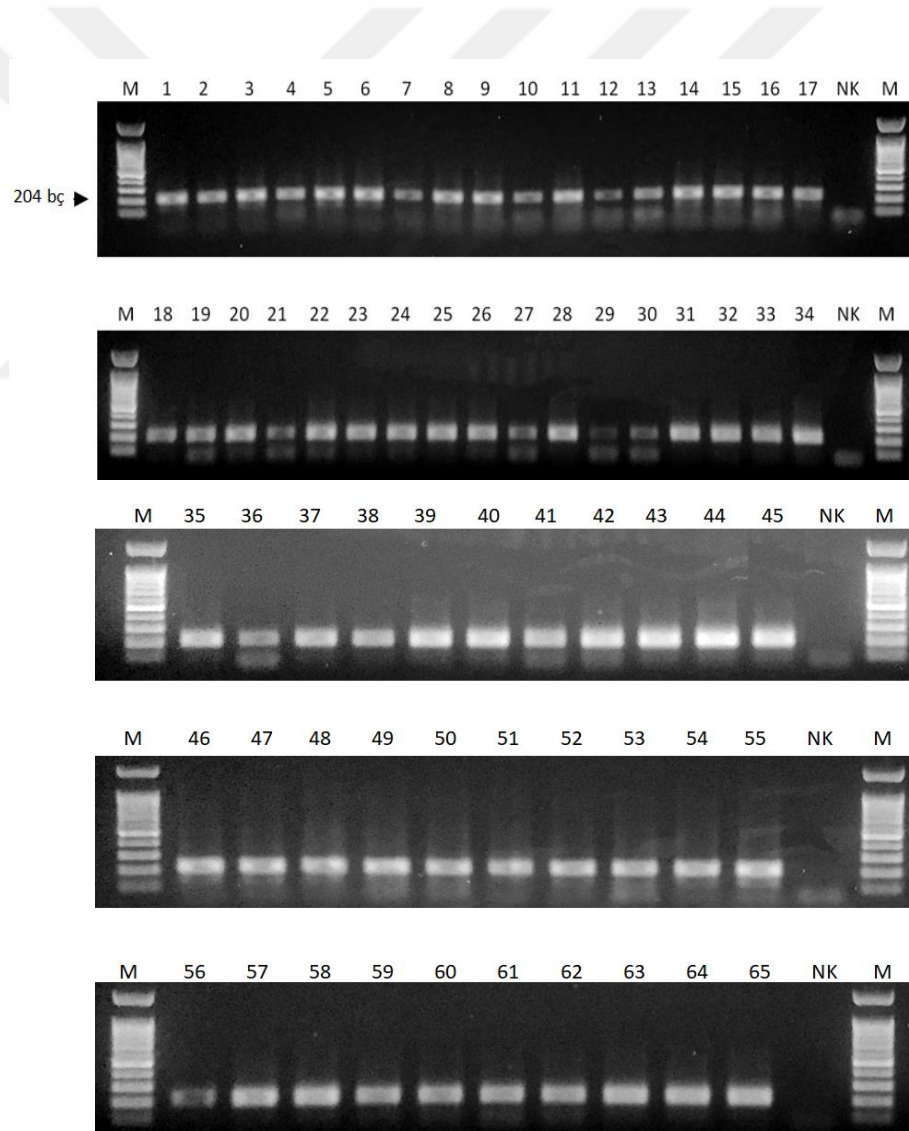
### 3.10. Sekanslama

EBV klonlanan pozitif plazmidler ve PCR ürünleri, İzgelab A.Ş. ve Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. laboratuvarlarına hizmet alımı yolu ile sekans analizi için gönderildi. Sekanslama işlemi söz konusu laboratuvarlarda EBV primer-3 kullanılarak çift yönlü olarak yapıldı. Sekans sonuçları MEGA7 programı kullanılarak analiz edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. PZR Bulguları

Örneklerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra PZR optimizasyonunda siklus sayısı annealing gibi değerler optimize edildi. GAPDH için kurulan PZR sonucunda tüm izole edilen örnekler housekeeping gen yönünden pozitif olarak tespit edildi (Şekil 4.1) ve DNA izolasyonu aşamasının başarı ile tamamlandığı teyit edildi.

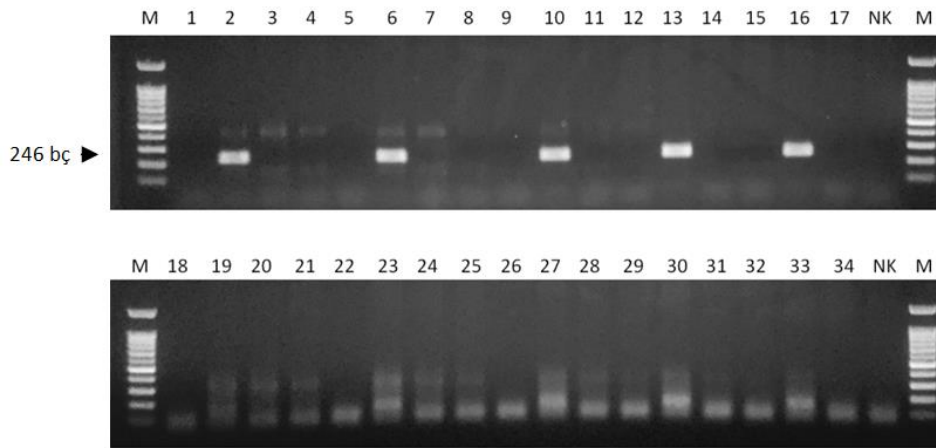


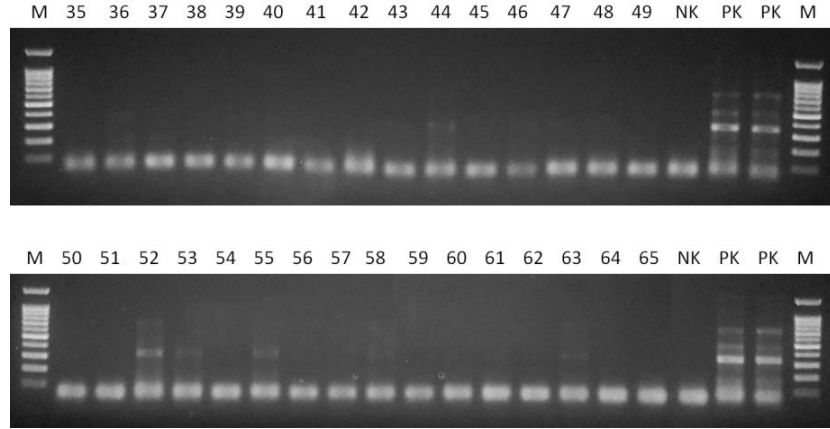
**Şekil 4.1.** Örneklerin insan GAPDH (204 bp) için kurulan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonrası görüntüleri. M: DNA marker (304125, Bioron, Almanya); 1-65: tezde incelenen tam kan DNA örnekleri; NK: PZR negatif kontrol steril dH<sub>2</sub>O.



#### 4.1.1. EBV

Örneklerde EBV taraması 3 farklı primer ile yapıldı (Çizelge 3.2). İlk kullanılan primer ile (EBV primer-1) pozitif kontrol örneği de dahil tüm örnekler negatif sonuç verdi. Ardından EBV primer-2 ile çalışmalara devam edildi ancak bu primer ile amplifiye olan ürünün büyüklüğü beklenen ürün büyüklüğünden farklı olması nedeniyle analizler için farklı bir primer çifti seçildi. Bunun üzerine EBV primer-3 ile çalışmalara devam edildi. EBV primer-3 ile yapılan deneyler sonucunda 7 örnekte EBV pozitifliği kaydedildi. Toplam 7 adet olan 10, 13, 21, 34, 54, 57 ve 59 numaralı örnekler EBV pozitif olarak kaydedildi. Pozitiflik görülen hastalardan 10 ve 59 numaralı örnekler ALL tanısı ile tedavi alan ve tedavisinin 33.gün örneği iken, tedavi almayan hasta grubundan 13, 21, 34, 54 ve 57 numaralı örneklerde pozitiflik belirlendi. Bu hastalardan 13, 21, 54 numaralı örnekler ALL tanısı konan hastalar iken, 34 ve 57 nolu örneklerin ait olduğu hastalarda ise Hodgkin lenfoma tanısı vardı.

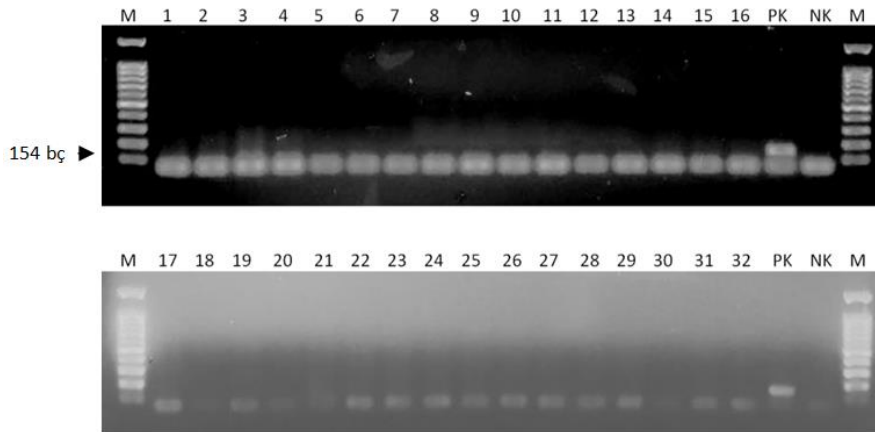


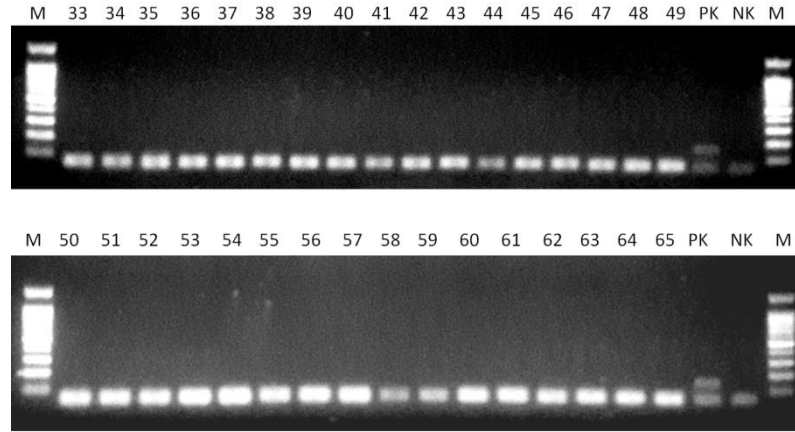


**Şekil 4.2.** EBV için primer-2 ile kurulan PZR ürünlerinin (246 bç) agaroz jel elektroforez sonrası görüntüleri. M: DNA marker (304125, Bioron, Almanya); 1-65: tezde incelenen tam kan DNA örnekleri; PK: EBV pozitif kontrolleri; NK: PZR negatif kontrol steril dH<sub>2</sub>O.

#### 4.1.2. Parvovirüs B19

Parvovirüs B19 için PZR koşulları optimizasyonu için pozitif kontrol örneği ile gradient PZR sonucunda primerin optimal çalışma ısı ve koşullar belirlendi. Optimizasyonun ardından çalışmaya dahil edilen 65 örnek Parvovirüs B19 yönünden PZR ile tarandı. İncelenen hiçbir örnekte Parvovirüs B19 yönünden pozitifliğe rastlanılmadı (**Şekil 4.3**).





**Şekil 4.3.** Parvovirüs B19 için kurulan PZR ürünlerinin (154 bç) agaroz jel elektroforez sonrası görüntüleri. M: DNA marker (304125, Bioron, Almanya); 1-65: tezde incelenen tam kan DNA örnekleri; PK: Parvovirüs B19 pozitif kontrolü; NK: PZR negatif kontrol steril dH<sub>2</sub>O.

#### 4.1.3. HTLV-1

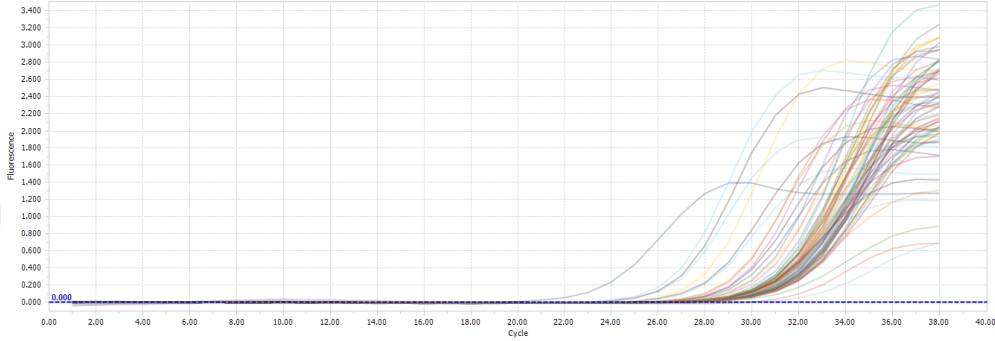
HTLV-1 için PZR koşulları optimizasyonu için primerin optimal çalışma ısısı ve koşullar belirlendi. Optimizasyonun ardından çalışmaya dahil edilen 65 örnek HTLV-1 yönünden PZR ile tarandı. İncelenen hiçbir örnekte HTLV-1 yönünden pozitifliğe rastlanılmadı.

#### 4.1.4. Kaposi Sarkoma İlişkili Herpesvirüs

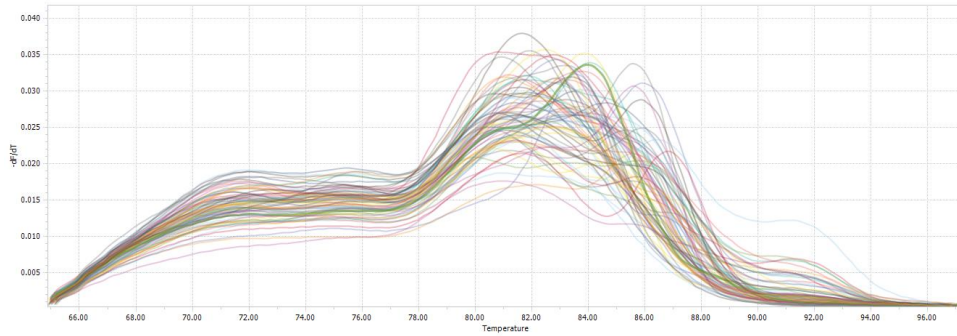
KSHV için PZR koşulları optimizasyonu için primerin optimal çalışma ısısı ve koşullar belirlendi. Optimizasyonun ardından çalışmaya dahil edilen 65 örnek KSHV yönünden PZR ile tarandı. İncelenen hiçbir örnekte KSHV yönünden pozitifliğe rastlanılmadı.

#### 4.2. Real-Time PZR Bulguları

PZR sonrasında tezde araştırılan tüm virüsler için real-time PZR kuruldu. PZR ile uyumlu olarak tüm örnekler HTLV-1, Parvovirüs B19 ve KSHV için negatif sonuç verdi. EBV için ise PZR’de olduğu gibi her 3 primer de denendi. EBV primer-1 ile kurulan real-time PZR sonuçlarına ait amplifikasyon eğrisinde (Şekil 4.4) ürünlerin amplifiye olduğu belirlendi. Ancak bu ürünlerin erime analizi yapıldığında ve Tm değerleri incelendiğinde (Şekil 4.5) ve tüm ürünler agaroz jele yüklendiğinde oluşan ürünlerin hedef ürün büyüklüğünden farklı olduğu belirlendi.

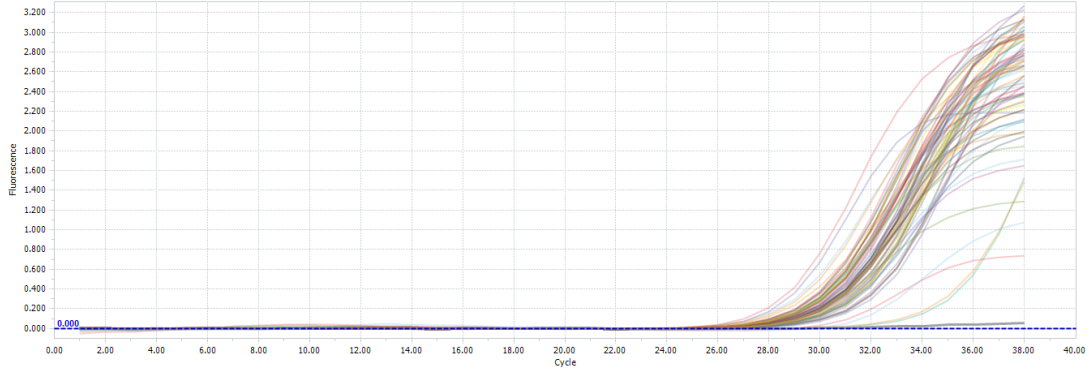


Şekil 4.4. EBV primer-1 ile kurulan real-time PZR amplifikasyon eğrisi grafiği.

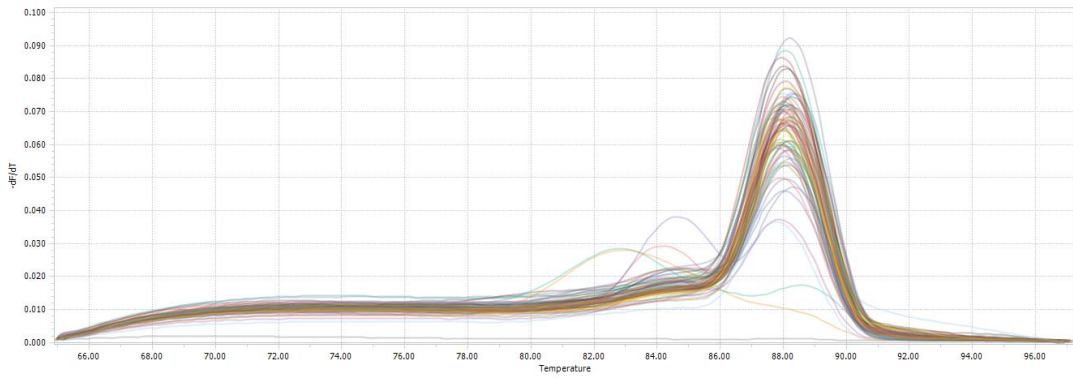


Şekil 4.5. EBV primer-1 ile kurulan real-time PZR Tm grafiği.

EBV için ikinci olarak denenen primer-2 ile yapılan real-time PZR sonrasında yine amplifikasyon eğrisinde (Şekil 4.6) pozitiflikler görüldü. Erime analizi grafiği (Şekil4.7) incelendiğinde ve ürünler agaroz jelde görüntülediğinde ise, oluşan ürünlerin hedef ürün büyüklüğünden farklı oldukları belirlendi.

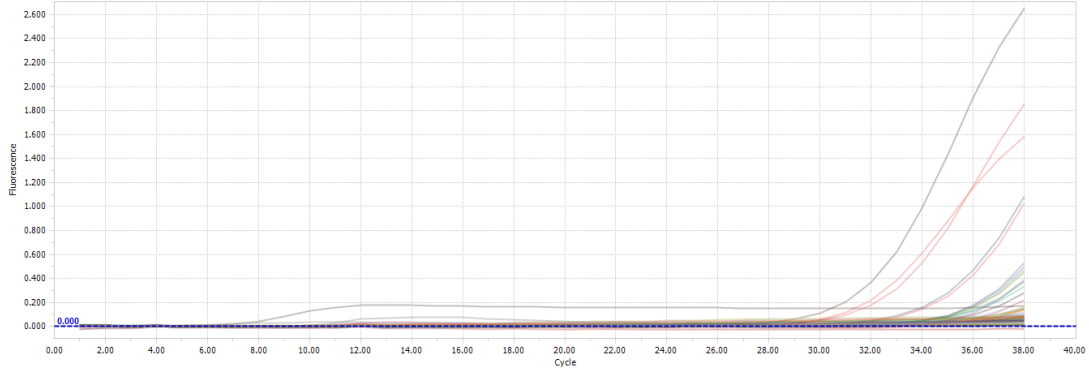


**Şekil 4.6.** EBV primer-2 ile kurulan real-time PZR amplifikasyon eğrisi grafiği.

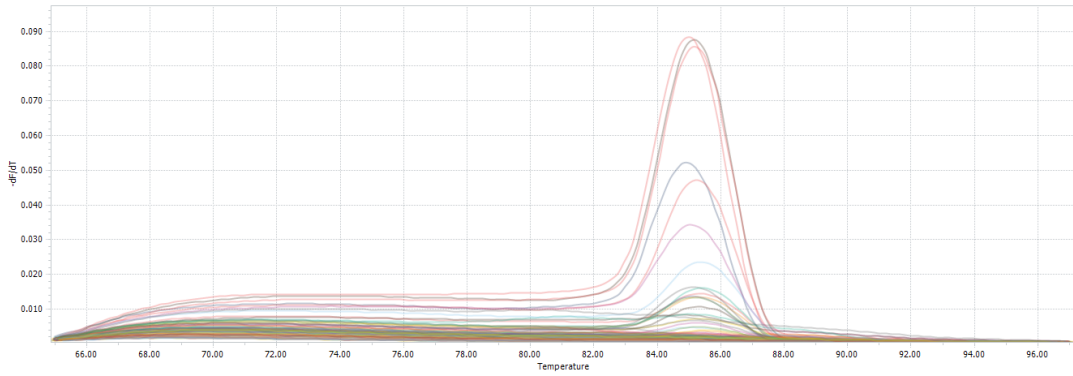


**Şekil 4.7.** EBV primer-2 ile kurulan real-time PZR Tm grafiği.

EBV primer-1 ve primer-2 ile hedeflenen ürünlerin çoğaltılmasında başarılı sonuç alınamadığı için seçilen primer-3 ile real-time PZR kuruldu. EBV primer-3 ile yapılan real-time PZR sonucunda amplifikasyon eğrisi (Şekil 4.8) ve erime analizi (Şekil 4.9) grafikleri incelendiğinde ürünlerin amplifikasyonlarının etkin biçimde gerçekleştiği belirlendi. Real-time PZR sonrasında oluşan ürünler agaroz jele yüklendiğinde hedef ürün büyüklüğünde bantların oluştuğu görüldü. EBV için primer-3 ile başarılı sonuç elde edildi.



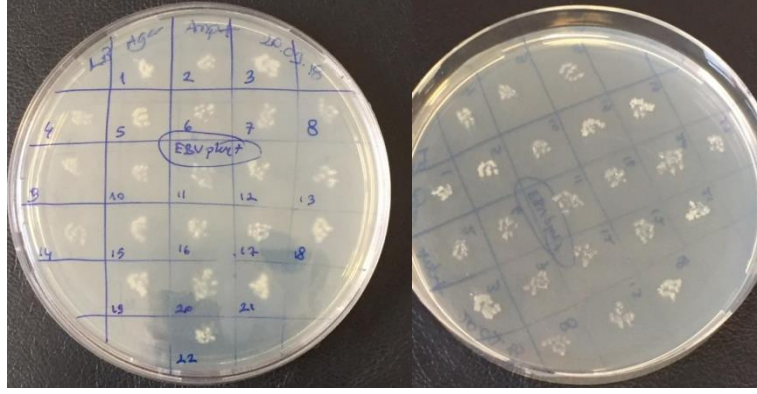
Şekil 4.8. EBV primer-3 ile kurulan real-time PZR amplifikasyon eğrisi grafiği.



Şekil 4.9. EBV primer-3 ile kurulan real-time PZR Tm grafiği.

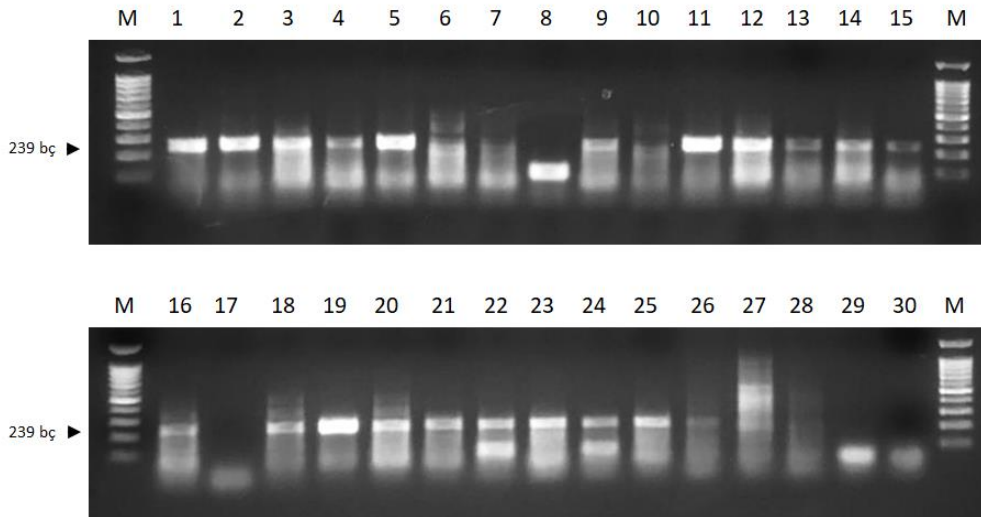
### 4.3. Klonlama ve Sekans Analizi

Tez kapsamında incelenen 4 viral etken arasında sadece EBV yönünden pozitiflik belirlendi. EBV primer-3 ile amplifiye edilen ürünlerin klonlaması başarı ile yapıldı. Klonlama sonucunda oluşan koloniler ampisilinli LB agarda gözlemlendi (Şekil 4.10).



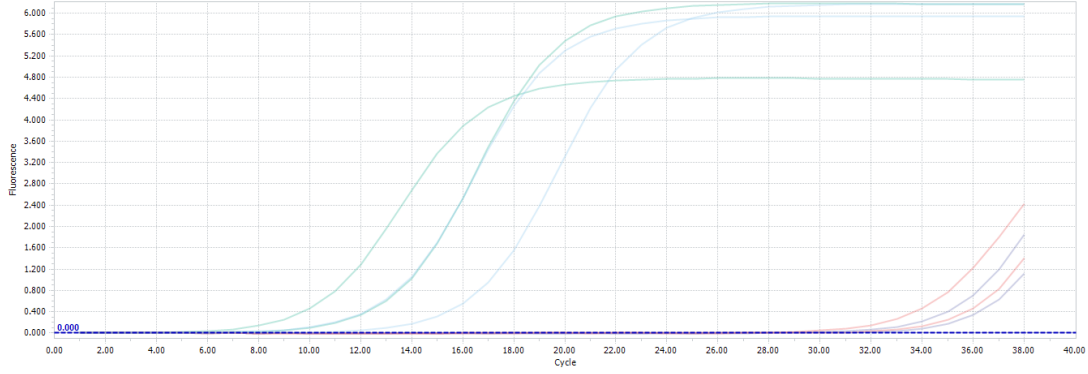
**Şekil 4.10.** EBV klonlanan *E.coli* kolonilerinin ampisilinli LB agardaki görüntüsü.

LB agarda oluşan *E.coli* kolonilerinden EBV primer-3 ile yapılan PZR tarama sonucunda (Şekil 4.11) klonlaması başarı ile yapılan koloniler seçildi.



**Şekil 4.11.** Kolonilerin EBV primer-3 ile yapılan PZR tarama agaroz jel görüntüsü. M: marker, 1-30: koloniler.

PZR taramada pozitifliği belirlenen *E.coli* kolonileri LB besisi yerinde üretildi ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere stokları yapılarak  $-80^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuya kaldırıldı. Bu *E.coli* stoklarından yapılan plasmid izolasyonu sonrasında elde edilen plasmid DNA'ları ile real-time PZR kuruldu ve pozitiflik teyit edildi (Şekil 4.12).



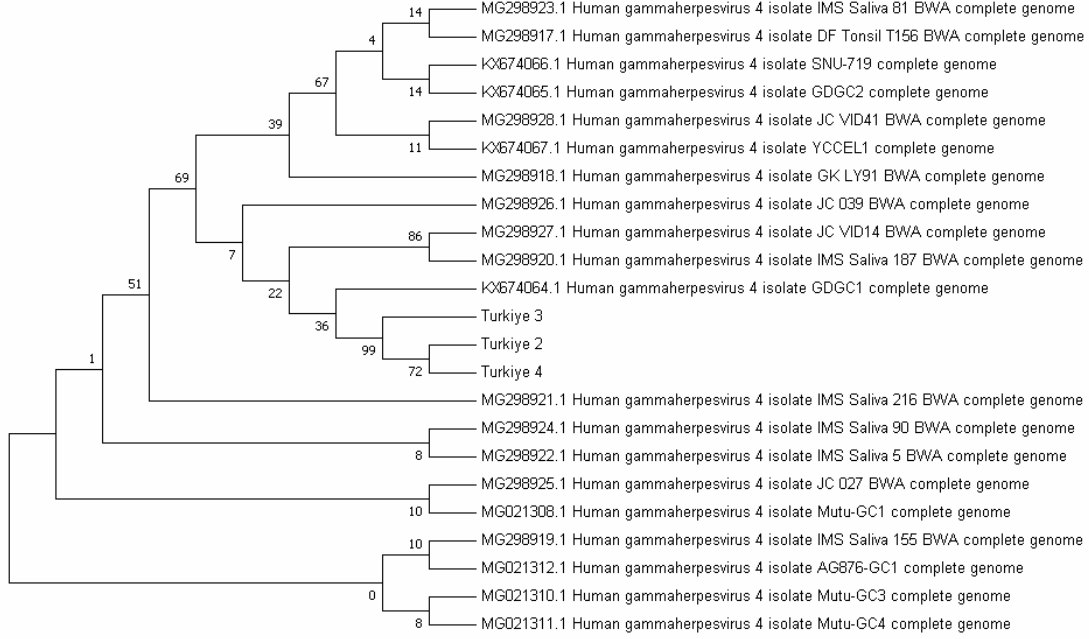
**Şekil 4.12.** İzolasyon sonrasında elde edilen plazmidlerin real-time PZR amplifikasyon eğri grafiği.

EBV klonlanan pozitif plazmidler ve PZR ürünlerinin sekans analizleri başarı ile tamamlandı. Sekans verileri MEGA7 programı ile analiz edildi ve filogenetik yakınlıklar belirlendi (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Çizelge 4.1).

MG298928.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_JC VID41_BWA_complete_genome	19,7	20,1	20,0	4,1	4,0	3,9	4,1	3,5	3,9	4,0	3,9	4,1	3,5	3,9	4,0	4,0	4,0	4,1	3,7	2,9	2,8	2,9	
Türkiye_2	49,8	19,4	11,0	19,6	19,2	19,6	19,6	19,7	19,6	19,6	19,5	19,6	19,6	19,7	19,7	19,7	19,7	19,7	19,7	19,7	19,6	19,6	19,6
Türkiye_3	52,4	50,3		19,3	19,8	20,4	20,2	20,2	20,1	20,2	20,3	19,7	20,2	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1	20,3	20,2	20,2	20,2
Türkiye_4	53,4	16,7	49,2		20,1	20,1	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,1	20,0	20,1	20,0	20,0	20,0	20,0	20,3	20,0	20,0	20,0	20,0
MG298927.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_JC VID14_BWA_complete_genome	16,1	49,5	52,7	53,6		4,1	4,0	3,7	4,0	4,1	4,0	3,8	3,9	3,9	4,1	3,9	4,3	4,2	4,1	4,2	3,7	3,9	4,0
MG298926.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_JC_039_BWA_complete_genome	15,5	47,1	53,0	54,1	16,0		4,1	3,1	4,0	3,7	3,9	4,0	2,5	3,9	4,0	3,5	4,2	4,2	3,9	4,0	4,1	4,0	3,7
MG298925.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_JC_027_BWA_complete_genome	15,5	51,1	52,9	52,7	15,5	15,9		3,6	4,1	3,8	2,2	4,0	3,8	3,7	3,8	4,3	4,3	4,5	3,9	4,1	4,3	4,0	4,3
MG298924.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_IMS_Saliva_90_BWA_complete_genome	16,3	51,1	52,9	52,7	14,5	12,1	13,9		4,1	3,5	3,6	3,9	3,7	3,9	4,3	4,3	4,2	3,9	4,0	4,1	3,9	3,9	3,9
MG298923.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_IMS_Saliva_81_BWA_complete_genome	13,9	49,8	52,4	53,4	15,8	15,6	16,4	16,1		4,1	4,1	4,0	3,8	4,1	3,4	4,0	4,2	4,0	4,1	3,4	3,7	3,7	3,6
MG298922.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_IMS_Saliva_5_BWA_complete_genome	15,2	51,1	52,9	52,7	14,3	14,7	13,7	16,1		3,8	4,1	3,7	3,9	4,0	4,0	4,1	3,9	4,2	4,1	4,3	4,3	4,1	4,1
MG298921.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_IMS_Saliva_216_BWA_complete_genome	15,5	52,0	53,4	53,4	15,5	15,5	8,0	14,3	16,1	15,3		2,1	3,7	3,9	4,1	4,2	4,4	4,3	4,0	4,1	4,1	4,1	4,1
MG298920.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_IMS_Saliva_187_BWA_complete_genome	15,9	49,2	52,9	53,6	14,9	15,9	15,8	15,8	16,2	7,5		4,1	4,0	4,3	4,3	4,0	4,2	4,0	4,2	3,9	3,9	3,9	3,9
MG298919.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_IMS_Saliva_155_BWA_complete_genome	15,9	51,1	52,9	52,7	15,3	9,8	14,7	14,5	14,8	14,7	14,7	15,8		3,9	3,9	3,8	4,1	4,2	4,0	4,0	4,2	3,8	3,9
MG298918.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_GK_LY91_BWA_complete_genome	14,0	49,5	52,4	53,6	16,4	15,3	14,7	15,3	16,1	15,5	15,4	15,8	15,4		3,9	3,8	4,3	3,9	3,9	4,4	3,5	3,6	3,7
MG298917.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_DF_Tonsil_T156_BWA_complete_genome	15,5	49,8	52,4	53,4	16,2	15,8	14,8	16,9	13,5	15,5	15,9	16,9	15,3	15,2		4,0	4,2	4,1	4,1	3,6	4,1	4,0	4,2
KX674067.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_YCCEL1_complete_genome	15,8	49,8	52,4	53,4	15,5	13,8	16,8	16,6	15,8	15,5	16,3	16,5	15,0	15,0	15,9		4,2	4,1	4,2	4,2	3,8	3,9	4,0
KX674066.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_SNU-719_complete_genome	15,7	49,8	52,4	53,4	16,8	16,5	17,0	16,3	16,3	16,2	17,0	15,5	16,0	16,8	16,5	16,3		3,6	4,3	4,2	3,9	3,9	4,0
KX674065.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_GDGC2_complete_genome	15,5	49,8	52,4	53,4	16,8	16,4	17,4	15,6	15,7	15,5	16,7	16,3	16,7	15,2	16,1	16,0	14,3		4,1	4,2	4,0	4,0	4,0
KX674064.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_GDGC1_complete_genome	16,0	51,1	53,6	53,1	16,3	15,4	15,2	15,6	16,2	16,3	15,8	15,9	15,7	15,3	16,0	16,4	16,8	16,2		4,2	4,0	4,0	4,0
MG021312.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_AG876-GC1_complete_genome	14,6	51,1	53,4	52,9	16,4	15,6	16,1	16,1	13,6	15,9	16,0	16,8	15,5	17,2	14,3	16,4	16,5	16,3	16,4		3,7	3,6	3,6
MG021310.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_Mutu-GC3_complete_genome	11,5	51,1	52,9	52,7	14,7	15,9	16,5	15,2	14,7	16,3	16,1	15,6	16,5	13,6	16,1	15,1	15,5	15,7	15,7	14,5		1,9	2,0
MG021311.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_Mutu-GC4_complete_genome	11,2	51,1	52,9	52,7	15,4	15,6	15,7	15,3	14,6	16,4	15,9	15,2	15,1	14,4	15,8	15,5	15,5	15,8	15,7	14,2		6,7	1,7
MG021308.1_Human_gammaherpesvirus_4_isolate_Mutu-GC1_complete_genome	11,5	51,1	52,9	52,7	15,6	14,5	16,9	15,4	14,1	15,9	16,3	15,3	15,3	14,5	16,3	15,7	15,6	15,8	15,8	14,1		7,1	5,4

**Şekil 4.13.** Tez çalışmasından elde edilen sekansların diğer sekanslar ile olan filogenetik yakınlıkları. Sekanslar arası baz yer değiştirmelerinin sayısı gösterilmiştir. Standart hata tahminleri diyagonal üzerinde belirtilmiştir. Analizler Maximum Composite Likelihood yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Tamura ve ark. 2004). Analizler 23 nükleotit sekansını içermektedir. Tüm belirsiz pozisyonlar her sekans çiftinden uzaklaştırılmıştır. Son veri setinde toplam 172764 pozisyon mevcuttur. Evrimsel analizler MEGA7 kullanılarak yapılmıştır (Kumar ve ark. 2016).





**Şekil 4.14.** EBV pozitif olan 3 örneğin sekans analizi sonrasında yapılan filogenetik analiz sonucu. Evrimsel tarih, Tamura-Nei modeline dayanan Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood ) yöntemi kullanılarak sonuçlandırılmaktadır (Tamura ve Nei 1993). 500 kopyadan elde edilen bootstrap konsensüs ağacı, analiz edilen sınıfın evrimsel tarihini temsil etmek için alınmaktadır (Felsenstein 1985). %50'den daha az olan bootstrap tekrarları ile çoğaltılan bölümlere karşılık gelen dallar daraltılmaktadır. İlişkili sınıfların birlikte gruplandırıldığı bootstrap testte, tekrar ağaçlarının yüzdeleri dalların yanında belirtilmiştir (Felsenstein 1985). Deneye dayalı arama için ilk ağaç/ağaçlar, Maksimum Kompozit Likelihood (MCL) yaklaşımı kullanılarak tahmin edilen bir çift mesafeli matrisine Neighbor-Join ve BioNJ algoritmalarını uygulayarak ve daha sonra, üst log olabilirlik değeriyle topolojiyi seçerek otomatik olarak elde edilmiştir. Analiz 23 nükleotit sekansını içermektedir. Boşlukları ve eksik veriyi içeren tüm pozisyonlar elimine edilmektedir. Son veri setinde toplam 203 pozisyon bulunmaktadır. Evrimsel analizler MEGA7 programında oluşturulmaktadır (Kumar ve ark. 2016).

**Çizelge 4.1.** Bu tez çalışmasından elde edilen izolatların birbirleri ile olan benzerlik yüzde matrisleri. Matrisler Clustal Omega 2.1 ile oluşturulmuştur.

	<b>Turkiye_3</b>	<b>Turkiye_2</b>	<b>Turkiye_4</b>
<b>Turkiye_3</b>	100.00	93.60	91.90
<b>Turkiye_2</b>	93.60	100.00	98.03
<b>Turkiye_4</b>	91.90	98.03	100.00

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Retrovirüsler insanlar da dahil olmak üzere pek çok hayvan türünü enfekte edebilmektedir. Virüsün tipine ve konakçıya göre retrovirüsler çeşitli kanserlere, immüno-supresif veya immün-aracılı hastalıklara neden olmaktadır. Retrovirüsler önemli bir enzim olan reverse transkriptazın 1970'lerin ortalarında Howard Temin ve David Baltimore tarafından bulunmasıyla bu ismi almışlardır. Ancak retrovirüslerle ilişkili hastalıklar bundan çok daha önce tanımlanmıştır (MacLachlan ve Dubovi 2011). İnsan T-hücre lenfotropik virüsü tip 1 (Human T-lymphotropic virus-1; HTLV-1; primate-lymphotropic virus-1) tanımlanan ilk insan retrovirüsüdür. 1980'de Robert Gallo tarafından insan T-hücre lösemi hücrelerinden izole edilmiştir ve bundan bağımsız olarak Japonya'da Mitsuaki Yoshida izole etmiştir (Poiesz ve ark. 1981, Yoshida ve ark. 1982).

HTLV-1 ve ATL arasındaki etiyolojik ilişki ATL'nin coğrafik kümeleşme gösterdiği epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir. HTLV-2 olarak sunulan ikinci insan retrovirüsü ilk olarak 1982'de bir lösemi hastasının hücre hattından izole edilmiştir (Kalyanaraman ve ark. 1982). Yapılan çalışmalar, HTLV-2 ile herhangi bir insan habis tümörünün bağlantısını henüz gösterememiştir. HTLV-1 aynı zamanda HTLV-1'in temel lösin zipper faktör (HBZ) olarak adlandırılan; T-hücrelerin çoğalmasını teşvik eden ve ATL hücrelerinde eksprese edilen bir proteini kodlar (Satou ve ark. 2006). Veriler göstermektedir ki hem *Tax* geni hem de *HBZ* genleri lösemi oluşumunda doğrudan rol almaktadır (Fujii ve Matsuoka 2013).

HTLV-1 Güney Batı Japonya'da endemiktir ve bazı bölgelerde popülasyonun %10'dan fazlasını etkiler aynı zamanda aşağı Sahra Afrika, Karayipler, İran ve Güney Amerika'da yaygındır. Bunun yanında çoğu HTLV -1 prevalans çalışmaları kan dönörleri, hamile kadınlar veya endemik bölgelerde alt popülasyonlara dayanırken taramaya girmeyen 20 milyondan fazla insan olduğu düşünülmektedir. Elli yaşın üzerindeki Avustralya Aborijinlerinin yaklaşık %50'sinin HTLV-1 ile enfekte olduğu bildirilmiştir (Kupferschmidt 2018, Kishihara ve ark. 2001, Proietti ve ark. 2005, Hlela ve ark. 2009).

Yaptığımız çalışmada HTLV-1 viral etkenin tespit için HTLV-1 (**Çizelge 3.2**) primerleri kullanıldı ve Pol gen bölgesi hedeflendi (Mahzounieh ve ark. 2015). Farklı literatürlerde HTLV'nin PZR ile belirlenmesinde *tax*, *env*, *gag* ve *pol* genlerine yönelik farklı primerler

kullanılmaktadır. HTLV-1 ve HTLV-2 için yüksek oranda korunmuş bölge olan tax genine spesifik primerler ile amplifikasyon yapıldığı görülmektedir. Bazı araştırmacılar ise HTLV-1'in genom tespiti için Tax geni hedef bölgesine özgül SK43 ve SK44 primerleri tercih etmiştir. Real-time PCR ile tanıdatax genine özgül olan bu primerlere ilave olarak problr (SK45, HTLV tax Tmgibi) da kullanılmaktadır. HTLV-1 ve HTLV-2'nin ayrımı için ise pol genine özgül primerler ile örnekler incelenir (Schüpbach ve Gallo 2000, Pripuzova ve ark. 2012, Castro ve ark. 2013). Yapılan bu tez çalışmasında farklı gen bölgeleri ve farklı primerler ile deneylerin tekrarlanması amaçlamaktayız.

Pirayeshfard ve arkadaşları (2018) İran'da bulunan HIV-1 ve talasemi pozitif olan hastalarda HTLV-1 varlığını araştırmışlardır. Kontrol olarak 2200 donörden aldıkları kan ile 100 adet HIV-1 ve talasemi pozitif hastadan aldıkları kanı ELISA ile incelemişler ve genomik DNA izolasyonu yapmışlardır. Tax ve LTR bölgelerine özgül primerler kullanarak örnekleri nested PZR ile incelemişlerdir. HIV pozitif hastaların %5'i, talasemi pozitif hastaların %8'i ve kontrol grubu olarak kullandıkları kanların ise %0.05'nin de HTLV-1 pozitifliği saptamışlardır. Becherer ve arkadaşları (2018) ise HTLV-1 tanısında loop-mediated isothermal amplification (LAMP) testinin kullanılmasını önermişlerdir. Bu tez de nested PZR kullanılmamış ve sınırlı örnekleme ile çalışılmıştır. Tüm dünyada yaklaşık 10 milyon HTLV-1 ile enfekte kişi olduğu rapor edilmektedir. Virüs bu hastaların yaklaşık %5'inde yetişkin T hücre (Adult T) hücre lösemi/lenfomaya neden olmaktadır. Avrupa'da Hollanda Antiller'inde HTLV-1 seroprevalansı %2 olarak saptanmıştır. Japonya ise HTLV-1 prevalansında dünyada en yüksek enfeksiyöz sıklığının görüldüğü ülke olarak bilinmektedir (van Tienen ve ark. 2018, Nosaka ve ark. 2017).

HTLV-1 taşınmasında kan nakli ve anneden bebeğin beslenmesinde süt önemli rol oynamaktadır. Japonya'da yapılan bir çalışmada HTLV pozitif annelerden beslenen çocuklarda ilk 12 ay içerisinde % 15.7 oranında pozitiflik saptandığı rapor edilmiştir. Bu tezde seçilen çocuk grubunda ise HTLV-1 saptanmamıştır. Fakat ülkemizde HTLV-1'in rapor edilmemesi ve tezde sadece 65 hastanın taramada kullanılması epidemiyolojik bir çalışmadaki güven aralığı için son derece düşüktür (Percher ve ark. 2016).

Retrovirüsler, insanda ciddi hastalık tabloları meydana getirdikleri ve yeryüzüne giderek yayılma eğilimleri nedeniyle, tıp dünyasının üzerinde önemle durduğu virüslerdir. Ülkemizde retrovirüslerle yapılmış yeterli sayı ve büyüklükte çalışma mevcut değildir, özellikle HTLV-1 yaygınlığı bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında lösemi ve lenfoma tanısı kesinleşen 33

pediatrik hastaya ait tedavi öncesi ve tedavi sonrası örnekleri araştırılmış, viral bir etkene rastlanılamamıştır. Bu oranlar endemik bir bölge olarak tanımlanmayan ülkemiz için oldukça dar kapsamlı bir araştırma olarak değerlendirilmektedir. Ülkemiz için HTLV-1'e yönelik çok merkezli ve büyük ölçekli prevalans çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır.

Epstein Barr virüsünün Burkitt lenfoma, Hodgkin lenfoma ve lösemi ile olan ilişkisi 1970'li yıllardan beri üzerinde çalışma yapılan bir konudur. Epstein Barr virüsünün HL patogenezinde rolü olduğu serolojik, epidemiyolojik ve moleküler çalışmalarla gösterilmiştir (Brouset ve ark. 1994). Afrika'da tanısı konulan endemik BL olgularının %98'inde EBV enfeksiyonu ilişkisi belirlenmiştir. Sporadik BL Ekvatoryal Afrika ve Papua Yeni Gine dışında görülür ve çoğunlukla çocukları ve ergenleri etkilemektedir. BL olgularının %30-40'ında EBV ilişkisi belirlenmiştir. BL, HIV taşıyıcılarında sporadik olgulara kıyasla 10-100 kat fazla görülmektedir (Kutok ve Wang 2006).

EBV primer enfeksiyondan sonra B lenfositlerde latent olarak ömür boyu süren persistan enfeksiyonlar oluşturabildiğinden EBV ile ilişkili hastalıkların tanısında rutin laboratuvar testleri yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla bu hastalıkların tanısında ve patogenezinin araştırılmasında viral yükün belirlenmesi önem arz etmektedir. EBV ile ilişkili hastalıkların tanısında rutin laboratuvar testleri yetersiz kalabilmektedir. Bu hastalıkların tanısı, takibi ve patogenezinin araştırılması için viral yükün belirlenmesi önem taşır. Moleküler teknolojideki gelişmeler EBV genomunun hızlı ve doğru olarak ölçümüne olanak sağlamaktadır. Ancak viral yükün saptanabileceği en uygun örnek türü EBV ile ilişkili hastalığa göre değişmektedir. Ayrıca laboratuvarlar arasında örnek türü, EBV saptama tekniği, viral yük değerleri arasında ortak bir fikir birliği oluşmamıştır. PZR, EBV ile ilişkili hastalıkların tanı ve takibinde kullanılan hızlı ve güvenilir bir yöntem olmakla birlikte uluslararası karşılaştırmalı çalışmalar için standardize edilmelidir (Kimura ve ark. 2008). EBV'nin EBNA-1 (Fellner ve ark. 2014, Ryan ve ark. 2004), EBER-2 (Kleer ve ark. 2002), BamH1W, LMP1, LMP2 ve BZLF1 (Ryan ve ark. 2004) genlerine özgül primerler kullanılarak EBV tanısı PZR ve/veya real-time PZR ile yapılabilmektedir. Bu tezde EBV için kullanılan ilk primer ile EBNA1 gen bölgesi hedeflenirken (Kubota ve ark. 2008), ikinci primerle ise EBNA3C gen bölgesi hedeflendi (Tamer 2006, Jin ve ark. 2010) (**Çizelge 3.2**). Kullanılan bu primerlerle yapılan deneylerden EBV etkenine rastlanamadı ve üçüncü primer olarak EBV primer-3 kullanıldı ve bununla Gp220 gen bölgesi hedeflendi (Telenti ve ark. 1990). EBV primer-3 ile sürdürülen çalışmalar neticesinde toplam 7 örnekte pozitiflik belirlendi. Tüm bu sonuçlar, EBV tespitinde hastalığın

tipinin ve çoğaltılmak istenen gen bölgesine uygun primerlerin kullanılmasının ne denli önemli olduğunu gösterdi.

Yeni tanı aşamasında ve immünsüprese hasta popülasyonunda belirli bir zaman diliminde ortaya çıkması muhtemel EBV enfeksiyonlarının tanısında, rutinde kullanılan testlerin etkinliği ve sonuçlarının doğruluğu tartışmalıdır. Bu tezde, 2010-2017 tarihleri arasında Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran ve tanısı kesinleşen hastalardan elde edilen ve -80°C'de dondurularak saklanan materyaller kullanılmıştır. Literatürde viral yükün belirlenmesinde materyal saklama koşulları, saklama süresi ve bunların viral yük üzerine etkisine dair fazla bilgi bulunmamaktadır.

Tez çalışmasına dahil edilen hasta gruplarından pozitiflik görülen 10, 13, 21, 54 ve 59 numaralı örnekler ALL, 34 ve 57 numaralı örnekler ise HL tanısı konulmuş hastalardı. ALL hastalarından 10 ve 59 numaralı örnekler, hastadan tedavinin 33. gününde toplandı ve EBV yönünden pozitif bulundu. Oysaki bu hastaların tedavi öncesine ait numunelerinde EBV saptanmadı. EBV pozitif olarak belirlenen 13, 21 ve 54 numaralı ALL hastaları ile 34 ve 57 numaralı HL hastalarının örnekleri ise tedavi öncesinde (0. gün) toplanan örneklerdi. Bu sonuçlar dahilinde EBV'nin, immünsüprese pediatrik hastalarda pozitif olabileceği gibi tedavi almayan yeni tanılı hastalarda da pozitiflik verebileceği görüldü.

İmmünokompetan ve immünsüprese kişilerde farklı tedavi stratejilerini gerektirdiği için EBV enfeksiyonlarının tanısında uygun yöntemlerin seçimi önem arz eder. İmmünsüprese hastalarda tedavi zamanı stratejiktir. EBV antijenin erken saptayan tanılar, tedavinin izlenmesine olanak sağlayan metod olarak tercih edilmelidir. Ancak böylece etkin bir tedavi gerçekleştirilebilir. Bu amaçla EBV veya EBV DNA'sını saptayabilen direkt tanı yöntemleri de kullanılmaktadır. İmmünokompetan kişilerde ise EBV enfeksiyonu tanısında serolojik profilin belirlenmesi önemlidir. Tanıda genellikle serolojik testlerden yararlanılan bu grupta, EBV serolojisi büyük oranda değişkenlik göstermekle birlikte, sonuçları yorumlamak zordur (Karadağ Geçgel 2011 ve Hess 2004).

Sehgal ve arkadaşlarının (2010) Hindistan'daki ALL tanılı pediatrik hastalarda yaptığı çalışmada hastaların kanlarında PZR ile EBV taraması yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre incelenen 25 örneğin 8 tanesinde EBV genomu saptanmış ve EBV pozitiflik oranı %32 olarak hesaplanmıştır. Sehgal ve arkadaşlarının (2010) kullandığı primerler BamH1-W bölgesine

özgül iken bu tezde kullanılan ve başarılı olan primer ise Gp220 bölgesine özgüldü. Bu tezde incelenen pediatrik hasta kanlarındaki EBV pozitifliği %10.76 bulundu. Dünyadaki ve ülkemizdeki diğer araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar ile bu tezdten elde edilen sonuçların pozitiflik oranları arasındaki farklar kullanılan yöntem, seçilen gen bölgesine ve incelenen klinik örneğin tipine göre farklılık gösterebilmektedir. Bazı çalışmalar, PZR ile western blotlama arasında teşhiste farklılık olabileceğini de göstermiştir. Örneğin bir çalışmada PZR ile %32 oranında EBV pozitifliği belirlenirken aynı örnekler western blotlama ile analiz edildiğinde EBV pozitifliği %20 olarak bulunmuştur (Sehgal ve ark. 2010).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada 56 tonsil dokusunda EBV, Parvovirüs B19, sitomegalovirüs, herpes simpleks virüs, adenovirüs, BK virüs varlığı real-time PZR ile araştırılmış ve bu viral etkenlerin arasında en sık görülenin %53.6'lık oranla EBV olduğu belirlenmiştir (Şahiner ve ark. 2014). Aynı çalışmada bazı hastalarda EBV ile Parvovirüs B19 ko-enfeksiyonu da saptanmıştır. Ancak bu tez kapsamında incelenen hastaların hiçbirinde ko-enfeksiyon belirlenmedi.

EBV'nin neden olduğu bir diğer klinik tablo da nazofarengeal karsinomadır. Ülkemizdeki retrospektif bir çalışma ile nazofarengeal karsinoma hastalarının örnekleri immunohistokimya ve *in situ* hibridizasyon ile incelendiğinde 82 örneğin 72'sinin (%87) EBV pozitif olduğu belirlenmiştir (Tatlı Doğan ve ark. 2016). Bu bağlamda EBV pozitifliğinin yüksek çıkmasında analiz edilen örneğin ve araştırma kapsamına alınan hastalığın önemli olduğu görülmektedir.

Sudan'da Ahmed ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada pediatrik lenfoid ve myeloid lösemi hastalarının tam kan örnekleri EBV yönünden PZR ile LMP1 gen bölgesine özgül primerler ile incelenmiştir. Hastaların %36.3'ünde EBV pozitifliği belirlenmiştir. ALL hastalarının %42.6'sı, AML hastalarının %33.3'ü ve kronik myeloid lösemi hastalarının %9'u EBV yönünden pozitif bulunmuştur. Çin'de yapılan benzer bir çalışmada ise ALL hastalarının %40.9'u, AML hastalarının %25.3'ü ve sağlıklı kontrollerin %5.4'ü EBV yönünden pozitif bulunmuştur. ALL hasta grupları kendi içinde incelendiğinde ise, B hücre ALL hastalarının %44.9 oranında, T hücre ALL hastalarının %8.3 oranında EBV yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir (Guan ve ark. 2017). Bu tez kapsamında araştırılan ve EBV pozitif olan hastalar ise ALL ve HL tanısı konulmuş hastalardı. Bu bilgiler dahilinde, araştırmaya alınan hastaların tanısının farklı olmasının da EBV varlığının geniş kapsamda incelenmesi için önemli bir nokta olarak görüldü.

Yetişkin ve pediatrik Hodgkin lenfoma hastalarının dokuları immunohistokimya ve *in situ* hibridizasyon ile incelendiğinde yetişkinlerin %31'inde ve pediatrik hastaların %55'inde EBV pozitif bulunmuştur (De Matteo ve ark. 2003). Tezde incelenen örnekler ise tamamen pediatrik hastalara aitti, bu nedenle farklı yaş gruplarındaki EBV varlığının kıyaslanması için ülkemizde daha geniş çapta çalışmaların yapılması gerekliliği fark edildi.

KSHV DNA sekansları kan, plazma, semen ve tükürük gibi çeşitli vücut sıvılarında tespit edilebilir. Bunun yanında enfeksiyonun esas olarak kontamine tükürük aracılığı ile yayıldığı görülmektedir. KSHV aktive olmuş B-hücreler, endotelyal hücreler, monositler (makrofajlar ve dendritik hücreleri kapsar) (Dedicoatve ark. 2004, Koelle ve ark. 1997).

Klasik KS'nin var olduğu Akdeniz popülasyonlarında ve çocukluk çağı KS'nin olduğu Sahra altı Afrika'da, KSHV'nin tükürük yoluyla anne-çocuğa bulaşması bulaşma yolunun en olası yoldur. HIV bulaşmış eşcinsel erkeklerde, bulaşma riskinin cinsel partner sayısı ile ilişkili olduğu durumlarda, muhtemelen en olası bulaşma yolunun da tükürük ile gerçekleşmesi olasıdır. Bu epidemiyolojik ilişkiler, KSHV'nin primer oral türevli epitelyal hücrelerde *in vitro* replike olabileceği gözlemiyle uyumludur. Kan transfüzyonu veya nakledilen organlar tarafından KSHV iletimi belgelendirilmiş olsa da, maliyet-yarar analizlerine dayanan çoğu ülke henüz KSHV enfeksiyonu için kan veya organ donörlerini düzenli olarak taramaz (Mesri ve ark. 2010).

KSHV tanısında serolojik testlerden immünofloresan antikor testi, immünoblotlama ve ELISA kullanılmaktadır. Moleküler testlerden PZR ve real-time PZR kullanılmaktadır. PZR için hedeflenen genler farklılık göstermektedir. ORFK1, ORFK2, ORF26, ORFK9, ORF72, ORF74, K6 gibi farklı gen bölgelerine spesifik primerler ile PZR çalışmaları yapılmıştır (Pan ve ark. 2001, Gogineni ve ark. 2013). Bu tezde, **Çizelge 3.2**'de gösterilen primerler kullanılmış ve ORF73 gen bölgesi hedeflenmiştir (Lallemand ve ark. 2000).

KSHV başta cinsel yol olmak üzere tükürük ve yakın temas ile bulaşabilmektedir. Ayrıca çok nadiren de olsa kan ve kan ürünleri, organ transplantasyonu ile bulaşı da bildirilmektedir (Dedicoat ve ark. 2004). KSHV diğer herpesvirüsler gibi dokularda latent olarak kaldığından, iatrojenik immünsüpresyon gibi vücut direncinin azaldığı durumlarda reaktif olarak çeşitli

klirik durumlara yol açabilir. Bu sebeple kazanılmış immünyetmezlik sendromlu (AIDS) hastalar ve organ transplantasyonu yapılan hastalar KSHV infeksiyonu açısından risk altındadır. AIDS'lı hastalarda ve transplant alıcılarında transplantasyon sonrası en sık görülen tümör Kaposi sarkom'dur. Organ transplant alıcılarda KSHV ile ilgili yapılan araştırmalarda sıklıkla Kaposi sarkom olguları incelenmiştir. Son zamanlarda KSHV ile Kaposi sarkomu arasındaki ilişki net olarak ortaya konulduktan sonra araştırmacılar transplant alıcılarının KSHV seroprevalansını inceleyen araştırmalara yönelmişlerdir. Kaposi sarkomu'nun endemik olarak görüldüğü bölgeler ile KSHV seroprevalansının yüksek olduğu bölgelerde transplant alıcılarda Kaposi sarkomu daha sık ortaya çıkmaktadır. şimdiye kadar Türkiye'de Kaposi sarkomlu olgular hariç toplumda transplant alıcılarda ve immünsüprese lösemi ve lenfoma tanılı hastalarda HHV-8 seroprevalansı ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Yapılan bu tezde 33 pediatrik lösemi ve lenfoma tanısı konmuş hastaların tedavi öncesi örnekleri ile tedaviyi takiben immünsüprese oldukları 33. gün örneklerinde KSHV viral etmeni araştırılmış ve sonuçlar negatif olarak tespit edilmiştir.

İnsan parvovirüs B19 viral yükün belirlenmesi için ELISA veya immunfloresan testi kullanılabilir. Ancak bu testler DNA testleri kadar duyarlı değildir. PZR testi diğer testlere göre son derece özgüldür ve duyarlı bir yöntemdir. PZR ile virüs dalakta, kemik iliğinde, değişik fetal organlarda ve amniyon sıvısında tesbit edilebilmektedir (Heegaard ve Brown 2002, Doymaz 2000).

Parvovirüs B19, insanlarda küresel ve yaygın bir enfeksiyöz patojendir. Parvovirüs B19'a karşı yöneltilen IgG antikorlarının prevalansı 1 ila 5 yaş arasındaki çocuklarda % 2-15, 6-19 yaş arası çocuklarda %15-60, yetişkinlerde %30-60 ve geriatric popülasyonda %85'ten fazladır. Doğurganlık ağındaki kadınlar, yıllık %1.5'luk bir sero dönüşüm oranını göstermektedir. Genel popülasyonda antikor yaygın olmasına rağmen, viremi veya viral DNA'nın varlığı nadirdir. Parvovirüs B19 serolojisi ve viremi ile ilgili pek çok çalışmanın aksine, sağlıklı bireylerin Parvovirüs B19 DNA'sının varlığı hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bir çalışmada 45 (%9) sağlıklı kemik iliği vericisinin 4'ünde Parvovirüs B19 DNA'sı bulunmuş ve bir diğerinde 13 kemik vericisinin kemik iliğinde Parvovirüs B19 DNA'sı olduğuna dair bir kanıt bulunamamıştır (Heegaard ve Brown. 2002).



İmmün eksikliği olanlarda kronik parvovirüs B19 enfeksiyonunu ve viral yükü göstermek özgül antikörlerin geç oluşmasından dolayı zor olabilir veya hiç gösterilemeyebilir. Hastalığın tanısında kemik iliği materyali kullanmak viral yükün tespiti açısından daha doğru olacaktır. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, kemik iliği yetersizliği nedeniyle nötralize edici bir antikör yanıtı oluşturamayan Parvovirüs B19 enfeksiyonu, kronik anemiye neden olduğu gibi akut lenfatik lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyeloid lösemi (KML), Burkitt lenfoması (BL), Wilms tümörü (WT), kombine immün yetmezlik sendromu (SCID) gibi hastalıkları yakalanma oranını artıran viral bir etken olduğu bilinmektedir (Heegaard ve Brown 2002).

İnsan parvovirüs B19, DNA yapısında, replikasyon için eritroid öncül hücreleri seçen bir virüstür. Eritema infeksiyozuma, kronik hemolitik anemisi olanlarda aplastik krizlere, immün eksikliği olanlarda kronik enfeksiyona sebep olabilir ayrıca immün olmayan hidrops fetalisin etiolojisinde yer almaktadır. Human parvovirus B19'un klinik genişliği içerisinde birçok çalışmanın yürütüldüğü alan Aplastik anemili hasta grubudur. Bu tez çalışmasında pediatrik 33 hasta grubunun tedavi öncesi ve sonrası örnekleri incelendi. Bu tez dahil edilen 65 örnek için parvovirüs B19 viral etmeni araştırıldı ve pozitifliğe rastlanılmadı.

Ülkemizde kanser tanılı çocuklarda parvovirüs B19 viral etmenine dair çalışma bulunmamaktadır. Genel olarak literatürde bu oran yetişkinlerde %40-65 arasında değişmektedir (Yarkın 1999, Murray ve ark. 1998). Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada 15 yaş üstü popülasyonda %53,3- %57,7 arasında pozitiflik saptanmıştır (Sodja ve ark. 1995). Bu tezde ise lösemi ve lenfoma hastalarına ait tam kan örnekleri kullanıldı. Lösemi ve lenfoma tanılı hastalar immünsüprese hastalar olduğundan viral etken tespiti oldukça zordur. Bu tezde aplastik anemi ve talasemi hastaları ile tekrarı durumunda parvovirüs B19 tespit edilebileceği düşünüldü.

Sonuç olarak bu tez ile pediatrik 33 hastaya ait toplam 65 tam kan örneğinde HTLV-1, Kaposi Sarkoma Herpesvirüs, Parvovirüs B19 ve Epstein-Barr virüs viral etkenleri araştırıldı. HTLV-1, Kaposi sarkoma herpesvirüs ve parvovirüs B19 yönünden tüm örnekler negatif olarak tespit edildi. Sadece örneklerin 7 tanesinde Epstein-Barr virüs hem PZR hem de real-time PZR ile pozitif olarak saptandı. Pozitif örneklerin sekans ve filogenetik analizleri sonucunda, elde edilen izolatların farklı olduğu tespit edildi. Kanser ile EBV ilişkisi çocuk hastalarda gösterilmek ile birlikte daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtildi.

## KAYNAKLAR

- AHMED HG, OSMAN SI, ASHANKYTY IM (2012) Incidence of Epstein-Barr virus in pediatric leukemia in the Sudan. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 12, 127-31.
- AKULA SM, NARANATT PP, WALIA NS, WANG FZ, FEGLEY B, CHANDRAN B (2003) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *Journal of Virology*, 77, 7978-7990.
- AL-ABDWANI RM, KHAMIS FA, BALKHAIR A, SACHARIA M, WALI YA (2008) A child with human parvovirus B19 infection induced aplastic anemia and acute hepatitis: effectiveness of immunosuppressive therapy. *Pediatr Hematol Oncol*, 25, 699-703.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (2018) Early History of Cancer. Erişim: [<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html>] Erişim tarihi: 29.05.2018
- ANDERSON MJ (1987) Human parvovirus infections. *J Virol Methods*, 17, 175-81.
- ANDRADE RG, RIBEIRO MA, NAMEN-LOPES MS, SILVA SM, BASQUES FV, RIBAS JG, CARNEIROPROIETTI AB, MARTINS ML (2010) Evaluation of the use of real-time PZR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43, 111-115.
- ARABZADEH SA, ALIZADEH F, TAVAKOLI A, MOLLAEI H, BOKHARAEI-SALIM F, KARIMI G, FARAHMAND M, MORTAZAVI HS, MONARAVI SH (2017) Human parvovirus B19 in patients with beta thalassemia major from Tehran, Iran. *Blood Research* 52, 50.
- ARVIN A, CAMPADELLI-FIUME G, MOCARSKI E, MOORE PS, ROIZMAN B, WHITLEY R, YAMANISHI K (2007) Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis editors. Cambridge University Press.
- AZKUR AK, BOLAT Y, DOYMAZ MZ (2003) Sığır Vebası Virüsü RBOK Aşı Suşu Matriks Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması ve TOPO XL Klonlama Vektörüne Yerleştirilmesi. *Turk J Vet Anim Sci*, 27, 229-233.
- AZKUR AK, KAYGUSUZ S, ASLAN ME, GAZYAGCI S, GOZUTOK S, TOYRAN KA (2013) A survey study on hantavirus, cowpox virus, and Leptospira infections in *Microtus hartingi* in Kirsehir Province, Central Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 37, 434-442.

- BAI XT, SINHA-DATTA U, KO NL, BELLON M, NICOT C (2012) Nuclear Export and Expression of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 tax/rex mRNA Are RxRE/Rex Dependent *Journal of Virology*, 86, 4559-65
- BALTIMORE D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226, 1209-11.
- BALTIMORE D (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*, 35, 235-41.
- BARBEAU B, PELOPONESE JM, MESNARDJM (2013) Functional comparison of antisense proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in viral pathogenesis. *Front Microbiol*, 4, 226.
- BARNARD AL, IGAKURA T, TANAKA Y, TAYLOR GP, BANGHAM CR (2005) Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood*, 106, 988-95.
- BECHERER L, BAKHEIT M, FRISCHMANN S, STINCO S, BORST N, ZENGERLE R, VON STETTEN F (2018) Simplified Real-Time Multiplex Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Novel Mediator Displacement Probes with Universal Reporters. *Anal Chem*, 90, 4741-4748.
- BELSON M, KINGSLEY B, HOLMES A (2007) Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*, 115, 138-45.
- BHUTANI M, POLIZZOTTO MN, ULDRICK TS, YARCHOAN R (2015) Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-associated malignancies: epidemiology, pathogenesis, and advances in treatment. *Semin Oncol*, 42, 223-46.
- BINDHU M, NAIR A, LAIRMORE MD (2004) Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. *Front Biosci*, 9, 2556-76.
- BONVICINI F, BUA G, CONTI I, MANARESI E, GALLINELLA G (2017) Hydroxyurea inhibits parvovirus B19 replication in erythroid progenitor cells. *Biochem Pharmacol*, 136, 32-39.
- BRENNAND JE CAMERON AD (2000) Human parvovirus B19 in pregnancy hospital medicine *Hosp. Med*, 61, 93-96.
- BROUSET P, SCHLAIFER D, MAGGETTO F (1994) Persistence of the same viral strain in early and late relapses of EBV -associated Hodgkin disease. *Blood*, 84, 2447.
- BROWN KE (2000) Haematological consequences of parvovirus B19 infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 13, 245-59.

- BROWN KE, MANDELL GL, BERNETT JE, DALM R (2000) Parvovirus B19 principles and practice of infectious diseases 5 ed, Churchill Livingstone Philadelphia.
- BURKITT D (1958) A sarcoma involving the jaws in African children. *British Journal of Surgery*, 46, 218-23.
- BURKITT D (1962) Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *British Medical Journal*, 2, 1019-23.
- CAMPBELL DM, RAPPOCCIOLO G, JENKINS F J, RINALDO CR (2014) Dendritic cells: key player in human herpesvirus-8 infection and pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 5, 452.
- CANN AJ, ROSENBLATT JD, WACHSMAN W, SHAH NP, CHEN IS (1985) Identification of the gene responsible for human T-cell leukaemia virus transcriptional regulation. *Nature*, 318, 571-574.
- CARON C, ROUSSET R, BÉRAUD C, MONCOLLIN V, EGLY JM, JALINOT P (1993) Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *EMBO J*, 12, 4269-78.
- CASSAR O, BLONDOT ML, MOHANNA S, JOUVION G, BRAVO F, MACO V, DUPREZ R, HUERRE M, GOTUZZO E, GESSAIN A (2010) Human herpesvirus 8 genotype E in patients with Kaposi sarcoma, Peru. *Emerg Infect Dis*, 16, 1459-62.
- CASTRO GM, BALANGERO MC, MATURANO E, MANGEAUD A, GALLEGOS SV (2013) Development and validation of a real-time PCR assay for a novel HTLV-1 tax sequence detection and proviral load quantitation. *Journal of Virological Methods*, 189, 383-7.
- CDC (2018) Laboratory Testing. Erişim: [<http://www.cdc.gov/epstein-barr/laboratory-testing.html>] Erişim tarihi: 29.05.2018
- CESARMAN E, CHANG Y, MOORE PS, SAID JW, KNOWLES DM (1995) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *The New England Journal of Medicine*, 332, 1186-1191.
- CESARMAN E (2013) Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Pathol*, 9, 349-72.
- CHADBURN A, ABDUL-NABI AM, TERUYA BS, LO AA (2013) Lymphoid proliferations associated with human immunodeficiency virus infection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137, 360-370.

- CHANDAR N, VISELLI S (2012) Lippincott's Illustrated Reviews: *Cell and Molecular Biology*. Hücre ve Moleküler Biyoloji. Çeviren: YANIK B. Nobel Tıp Kitabevi.
- CHANDRAN B (2010) Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of target cells. *Journal of Virology*, 84,2188–2199.
- CHANG Y, CESARMAN E, PESSIN MS, LEE F, CULPEPPER J, KNOWLES DM, MOORE PS (1994) Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS associated Kaposi's sarcoma. *Science*, 266, 1865–9.
- CHARNEAU P, ALIZON M, CLAVEL F (1992) A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol*, 66, 2814–2820.
- CHIARETTI S, ZINI G, BASSAN R (2014) Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 6,2014073.
- CHO J, KANG MS, KIM KM (2016) Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response. *J Gastric Cancer*, 16, 1-7.
- CIMINALE V, PAVLAKIS GN, DERSE D, CUNNINGHAM CP, FELBER BK (1997) Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. *J Virol*, 66, 1737-45.
- CIMINALE V, ZOTTI L, D'AGOSTINO DM, FERRO T, CASARETO L, FRANCHINI G, BERNARDI P, CHIECO-BIANCHI L (1999) Mitochondrial targeting of the p13II protein coded by the x-II ORF of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Oncogene*, 18, 4505-14.
- COAKLEY E, PETROPOULOS CJ, WHITCOMB JM (2005) Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Curr Opin Infect Dis*, 18, 9-15.
- COHEN B (1995) Parvovirus B19 expanding spectrum of disease. *Br Med J*, 311, 1549-1552.
- CONZELMANN KK (2005) Transcriptional activation of alpha/beta interferon genes interference by nonsegmented negative-strand RNA viruses. *J Virol*, 79, 5241–5248.
- COOK LB, MELAMED A, NIEDERER H, VALGANON M, LAYDON D, FORONI L, TAYLOR GP, MATSUOKA M, BANGHAM CR (2014) The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 123, 3925-31.
- COSTA, EA, MAGRI, MC, CATERINO-DE-ARAUJO A (2011) The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. *Journal of Virology Methods*, 173, 280-286

- CRUMP C, SUNDQUIST K, SIEH W, WINKLEBY MA, SUNDQUIST J (2012) Perinatal and family risk factors for non-Hodgkin lymphoma in early life: a Swedish national cohort study. *J Natl Cancer Inst*, 104, 923-30.
- CULLEN BR (1992) Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev*, 56, 375-94.
- CURTISS P, STRAZZULLA LC, FRIEDMAN-KIEN AE (2016) An Update on Kaposi's Sarcoma: Epidemiology, Pathogenesis and Treatment. *Dermatol Ther(Heidelb)*, 6, 465-470.
- CURRER R, DUYNE RV, JAVROSKI E, GUENDEL I, SAMPEYG, RAVI DAS R, NARAYANAN A, KASHANCHI F(2012)HTLV Tax: A Fascinating Multifunctional Co-Regulator of Viral and Cellular Pathways, *Front Microbiol*, 3, 406.
- D'AGOSTINO DM, RANZATO L, ARRIGONI G, CAVALLARI I, BELLEUDI F, TORRISI MR, SILIC-BENUSSI M, FERRO T, PETRONILLI V, MARIN O, CHIECO-BIANCHI L, BERNARDI P, CIMINALE V (2002) Mitochondrial alterations induced by the p13II protein of human T-cell leukemia virus type 1. Critical role of arginine residues. *J Biol Chem*, 277, 34424-33.
- D'AGOSTINO DM, CIMINALE V, ZOTTI L, ROSATO A, CHIECO-BIANCHI L (1997) The human T-cell lymphotropic virus type 1 of protein contains a bipartite nuclear localization signal that is able to functionally replace the amino-terminal domain of Rex. *J Virol*, 71, 75-83.
- DASKALOGIANNI C, PYNDIAH S, APCHER S, MAZARS A, MANOURY B, AMMARI N, NYLANDER K, VOISSET C, BLONDEL M, FAHRAEUS R (2015) Epstein–Barr virus-encoded EBNA1 and ZEBRA: targets for therapeutic strategies against EBV-carrying cancers. *Journal of Pathology*, 235, 334–341.
- DE MATTEO E, BARÓN AV, CHABAY P, PORTA J, DRAGOSKY M, PRECIADO MV (2003) Comparison of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients. *Arch Pathol Lab Med*, 127, 1325-9.
- DEDICOAT M, NEWTON R, ALKHARSAH KR, SHELDON J, SZABADOS I, NDLOVU B, PAGE T, CASABONNE D, GILKS CF, CASSOL SA, WHITBY D, SCHULZ TF (2004) Mother-to-child transmission of human herpesvirus-8 in South Africa. *The Journal of Infectious Diseases*, 190,1068–1075.
- DERSE D, CRISE B, LI Y, PRINCLER G, LUM N, STEWART C, MCGRATH CF, HUGHES SH, MUNROE DJ, WU X (2007) Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J Virol*, 81, 6731-41.
- DERSE D, HILL SA, LLOYD PA, CHUNG HK, MORSE BA (2001) Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J Virol*, 75, 8461-8.

- DESAGHER S, MARTINOUC JC (1993) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 10, 369-77.
- DIAMANDOPOULOS GT (1996) Cancer: an historical perspective. *Anticancer Res*, 16, 1595–602.
- DILLON PJ, GREGORY SM, TAMBURRO K, PECK MK, JOHNSON GL, TRAUB NR, DIRK P (2013) Dittmer, and Blossom Damania. Touselike Kinases Modulate Reactivation of Gammaherpesviruses from Latency. *Cell Host Microbe*, 13, 204–214.
- DITTMER DP (2010) Transcription profile of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in primary Kaposi's sarcoma lesions as determined by real-time PCR arrays. *Cancer Res*, 63, 2010-5.
- DONHAUSER N, HEYM S, THOMA-KRESS AK (2018) Quantitating the Transfer of the HTLV-1 p8 Protein Between T-Cells by Flow Cytometry. *Front Microbiol*, 7, 400.
- DOYMAZ M Z (2000) Medical Virology. *Medikal Viroloji*. Nobel Tıp Kitabevi.
- EPSTEIN MA, HENLE G, ACHONG B G, BARR Y M (1965) Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*, 121, 761–70.
- ERKURT MA, AYDOĞDU İ (2007) ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AND PREKURSOR B-CELL LYMPHOMAS *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007, 3(19):43-54
- ERRIHANI H, BERRADA N, RAISSOUNI S, RAIS F, MRABTI H, RAIS G (2011) Classic Kaposi's sarcoma in Morocco: Clinico-epidemiological study at the National Institute of Oncology. *BMC Dermatol*, 11, 15.
- EVANG I, WYLLIEA H, GILBERT CS, LITTLEWOODT D, LANDH, BROOKSM, WATERSC M, PENNL Z, HANCOCK DC (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by cmc protein. *Cell*, 69, 119–128.
- EVANS MJ, VON HAHN T, TSCHERNE DM, SYDER AJ, PANIS M, WOLK B, HATZIOANNOU T, MCKEATING JA, BIENIASZ PD, RICE CM (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446, 801–805.
- FADLY A M, NAIR V (2008) Leukosis/Sarcoma Group. In: Diseases of Poultry. Ed. SAIF Y M, Blackwell Publishing, Iowa, USA, chapter 15.
- FAGIN U, NERBAS L, VOGL B, JABS WJ (2017) Analysis of BZLF1 mRNA detection in saliva as a marker for active replication of Epstein-Barr virus. *J Virol Methods*, 244, 11-16.

- FATAHZADEH M (2012) Kaposi sarcoma: review and medical management update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio*, 113, 2-16.
- FELBER BK, PASKALIS H, KLEINMAN-EWING C, WONG-STAAAL F, PAVLAKIS GN (1985) The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats *Science*, 229, 675-9.
- FELLNER MD, DURAND K, RODRIGUEZ M, IRAZU L, ALONIO V, PICCONI MA (2014) Dublex realtime PCR method for Epstein-Barr virus and human DNA quantification: its application for post-transplant lymphoproliferative disorders detection. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18, 271-80.
- FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- FIORUCCI G, CHIANTORE MV, MANGINO G, ROMEO G (2015) MicroRNAs in virus-induced tumorigenesis and IFN system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26, 183–194.
- FISHER C, MONTGOMERY EA, THWAY K (2013) Yumuşak Doku Biyopsilerinin Yorumu. Çev. Ed: Dervişoğlu S. *Nobel Tıp Kitabevi*, pp.416-419.
- FONTANA JM, MYGATT JG, CONANT KL, PARSONS CH, KALEEBA JA (2014) Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Subversion of the Anti-Inflammatory Response in Human Skin Cells Reveals Correlates of Latency and Disease Pathogenesis. *J Skin Cancer*, 2014, 246076.
- FRANKLIN AA, KUBIK MF, UITTENBOGAARD MN, BRAUWEILER A, UTAISINCHAROEN P, MATTHEWS MA, DYNAN WS, HOFFLER JP, NYBORG JK (1993) Transactivation by the human T-cell leukemia virus Tax protein is mediated through enhanced binding of activating transcription factor-2 (ATF-2) ATF-2 response and cAMP element-binding protein (CREB). *J Biol Chem*, 268, 21225-31.
- FUJII M, MATSUOKA (2013) Human T-cell Leukemia virus types 1 and 2 In: DM Knipe PMH editor; *Fields Virology* 6 th ed. Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins, pp1474-501.
- FURUKAWA K, FURUKAWA K, SHIKU H (1991) Alternatively spliced mRNA of the pX region of human T lymphotropic virus type I proviral genome. *FEBS Lett*, 295, 141-5.
- FURUKAWA M, KAJI K, MASUDA H, OZAKI K, ASADA S, KOIZUMI A, KUBO T, NISHIMURA N, SAWADA Y, TAKEDA K, MASHITANI T, KUBO M, AMANO I, OOTANI T, OHBAYASHI C, MURATA K, ANN T, MITORO A, YOSHIJI H (2017) Severe Aplastic Anemia following Parvovirus B19-Associated Acute Hepatitis. *Case Reports Hepatol*, 2017, 1359486.



- FUTREAL P A, KASPRZYK A, BIRNEY E, MULLIKIN J C, WOOSTER R, STRATTON M (2001) Cancer and genomics. *Nature*, 6822, 850-2.
- GALLO RC, REITZ MS.(2010) RNA TUMOR VIRUSES. IN: HONG WK, BAST RC, HAIT WN, KUFE DW, POLLOCK RE, WEICHSELBAUM RR Holland-Frei Cancer Medicine. 8th ed. Shelton Connecticut: People's Medical Publishing House, pp 279-91.
- GANEM D (2010) KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. *J Clin Invest*, 120, 939-49.
- GHEZ D, LEPELLETIER Y, LAMBERT S, FOURNEAU JM, BLOT V, JANVIER S, ARNULF B, VAN ENDERT PM, HEVEKER N, PIQUE C, HERMINE O (2006) Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol*, 80, 6844-54.
- GIAM CZ, OLIVER JOHN SEMMES (2016) HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. *Viruses*, 8, pii: E161.
- GIFFIN L, DAMANIA B (2014) KSHV: pathways to tumorigenesis and persistent infection. *Adv Virus Res*, 88, 111-59.
- GOGINENI E, MARSHALL V, MILEY W, BAYAT A, WHITBY D, KOVACS JA, BURBELOC PD (2013) Quantitative determinations of anti-Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) antibody levels in men who have sex with men. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76, 56-60.
- GRAYSON W, PANTANOWITZ L (2008) Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Diagn Pathol*, 3, 31.
- GRYWALSKA E, ROLINSKI J (2015) Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Seminars in oncology*, 42, 291-303.
- GUAN H, MIAO H, MA N, LU W, LUO B (2017) Correlations between Epstein-Barr virus and acute leukemia. *J Med Virol*, 89, 1453-1460.
- HAHN AS, KAUFMANN JK, WIES E, NASCHBERGER E, PANTELEEV-IVLEV J, SCHMIDT K, HOLZER A, SCHMIDT M, CHEN J, KÖNIG S, ENSSER A, MYOUNG J, BROCKMEYER NH, STÜRZL M, FLECKENSTEIN B, NEIPEL F (2012) The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature medicine*, 18, 961-966.
- HAJDU SI (2012) A note from history: landmarks in history of cancer, part 4. *Cancer*, 118, 4914-4928.

- HAMMERSCHMIDT W, SUGDEN B (2013) Replication of Epstein-Barr viral DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5, a013029.
- HANON E, STINCHCOMBE JC, SAITO M, ASQUITH BE, TAYLOR GP, TANAKA Y, WEBER JN, GRIFFITHS GM, BANGHAM CR (2000) Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity*, 13, 657-64.
- HEEGAARD ED, BROWN KE (2002) Human Parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev*, 15, 485-505.
- HENLE G, HENLE W (1966) Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol*, 91, 1248-56.
- HESS RD (2004) Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3381-3387.
- HIDAKA M, INOUE J, YOSHIDA M (1988) Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J*, 7, 519-523.
- HINUMA Y, NAGATA K, HANAOKA M, NAKAI M, MATSUMOTO T, KINOSHITA K I, SHIRAKAWA S, MIYOSHI I (1981) Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78, 6476-80.
- HIRARAGI H, MICHAEL B, NAIR A, SILIC-BENUSSI M, CIMINALE V, LAIRMORE M (2005) Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13II sensitizes Jurkat T cells to Ras-mediated apoptosis. *J Virol*, 79, 9449-57
- HIRARAGI H, KIM SJ, PHIPPS AJ, SILIC-BENUSSI M, CIMINALE V, RATNER L, GREEN PL, LAIRMORE MD (2006) Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13(II) is required for viral infectivity in vivo. *J Virol*, 80, 3469-76.
- HLELA C, SHEPPERD S, KHUMALO NP, TAYLOR GP (2009 ) The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. *AIDS Rev*, 11, 205-14.
- HO DD, ROTA TR, HIRSCH MS (1984) Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad*, 81, 7588-90.
- HOWLEY PM (2015) Infectious agents and cancer. In: The Molecular Basis of Cancer. Ed. MENDELSON J, GRAY JW, HOWLEY PM, ISRAEL MA, THOMPSON CB, PA: *Elsevier Saunders*, pp 79-102.
- HOXIE JA, MATTHEWS DM, CINES DB (1984) Infection of human endothelial cells by human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 7591-5.

- IARC (2018) Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–121. Erişim: [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/] Erişim tarihi: 29.05.2018
- ICTV (2017) Virus Taxonomy: 2017 Release. Erişim: [http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp] Erişim tarihi: 29.05.2018
- IIZASA H, NANBO A, NISHIKAWA J, JINUSHI M, YOSHIYAMA H (2012) Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses*, 4, 3420-39
- INFANTE-RIVARD C, WEICHENTHAL S (2007) Pesticides and childhood cancer: an update of Zahm and Ward's 1998 review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 10, 81-99.
- ISHIHARA K, INOKUCHI N, TSUSHIMA Y, TSURUDA K, MORINAGA Y, HASEGAWA H, YANAGIHARA K, KAMIHIRA S (2014) Relevance of molecular tests for HTLV-1 infection as confirmatory tests after the first sero-screening. *J Immunoassay Immunochem*. 35, 74-82.
- ITO TK, ISHII G, CHIBA H, OCHIAI A (2007) The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene*, 26, 7194-203.
- JABER T, YUAN Y (2013) A virally encoded small peptide regulates RTA stability and facilitates Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. *J Virol*, 87, 3461-70.
- JAVIER RT, BUTEL JS (2008) The History of Tumor Virology. *Cancer Res*, 68, 7693-706.
- JIN Y, XIE Z, LU G, YANG S, SHEN K (2010) Characterization of variants in the promoter of BZLF1 gene of EBV in nonmalignant EBV-associated diseases in Chinese children. *J Virol*, 7, 92.
- JOHNSON JM, MULLOY JC, CIMINALE V, FULLEN J, NICOT C, FRANCHINI G. (2000) The MHC class I heavy chain is a common target of the small proteins encoded by the 3' end of HTLV type 1 and HTLV type AIDS Res. *Hum Retroviruses*, 16, 1777-81.
- JOHNSON JM, NICOT C, FULLEN J, CIMINALE V, CASARETO L, MULLOY JC, JACOBSON S, FRANCHINI G (2001) Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell. *J Virol*, 75, 6086-94.
- JONES KS, PETROW-SADOWSKI C, BERTOLETTE DC, HUANG Y, RUSCETTI FW (2005) Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol*, 79, 12692-702.

- JONES KS, PETROW-SADOWSKI C, HUANG YK, BERTOLETTE DC, RUSCETTI FW(2008) Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med*, 14, 429-36.
- KALEEBA J A, BERGER E A (2006) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus fusion-entry receptor: Cystine transporter xCT. *Science*, 311, 1921–1924.
- KALYANARAMAN VS, SARNGADHARAN MG, ROBERT-GUROFF M, MIYOSHI I, GOLDE D, GALLOR C (1982) A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with aT-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, 218, 571–3.
- KANG MS, KIEFF E (2015) Epstein-Barr virus latent genes *Exp Mol Med*, 47, 84.
- KASHANCHI F, BRADY JN (2005) Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene*, 24, 5938-51.
- KEMPKES B, ROBERTSON E S (2015) Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Current Opinion in Virology*, 14, 138-144.
- KERR JR (2000) Pathogenesis of human parvovirus B19 in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis*, 59, 672-683.
- KIM SJ, DING W, ALBRECHT B, GREEN PL, LAIRMORE MD (2003) A conserved calcineurin-binding motif in human T lymphotropic virus type 1 p12I functions to modulate nuclear factor of activated T cell activation. *J Biol Chem*, 278, 15550-7.
- KIMURA H, ITO Y, SUZUKI R, NISHIYAMA Y (2008) Measuring Epstein-Barr virus load: The significance and application for each EBV associated disease. *Rev Med Virol*, 18, 305-19.
- KISHIHARA Y, FURUSYO N, KASHIWAGI K, MITSUTAKE A, KASHIWAGI S, HAYASHI J (2001) Human T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis*, 184, 1114-9.
- KISHIHARA Y, FURUSYO N, KASHIWAGI K, MITSUTAKE A, KASHIWAGI S, HAYASHI J (2001) Human T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. *Journal of Infectious Diseases*, 184, 1114–1119.
- KLEER CG, TSENG MD, GUTSCH DE, ROCHFORD RA, WU Z, JOYNT LK, HELVIE MA, CHANG T, VAN GOLEN KL, MERAJVER SD (2002) Detection of Epstein-Barr virus in rapidly growing fibroadenomas of the breast in immunosuppressed hosts. *Modern Pathology*, 15, 759-64.
- KLEIN E, KLEIN G (2009) Burkitt lymphoma. *Seminars in Cancer Biology*, 19, 345-346.

- KLEIN G, KLEIN E, KASHUBA E (2010) Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 67–73.
- KNIPE DM, HOWLEY PM (2013) Fields virology/editors-in-chief, – 6th ed. 1474-1495.
- KOELLE DM, HUANG ML, CHANDRAN B, VIEIRA J, PIEPKORN M, COREY L (1997) Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: Clinical and immunologic correlates. *Journal of Infectious Diseases*, 176, 94–102.
- KONVALINKA J, KRÄUSSLICH HG, MULLER B (2015) Retroviral proteases and their roles in virion maturation. *Virology*, 479-480, 403-17.
- KORALNIK I, MULLOY JC, ANDRESSON T, FULLEN J, FRANCHINI G (1995) Mapping of the intermolecular association of human T cell leukaemia/lymphotropic virus type I p12I and the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase 16 kDa subunit protein. *J Gen Virol*, 76, 1909-16.
- KORALNIK IJ, GESSAIN A, KLOTMAN ME, LO MA, BERNEMAN ZN, FRANCHINI G (1992a) Protein isoforms encoded by the pX region of human T cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci*, 89, 8813-8817.
- KORALNIK IJ, LEMP JF JR, GALLO RC, FRANCHINI G (1992b) In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *AIDS Res Hum Retroviruses*, 8, 1845-9.
- KRISHNAN HH, SHARMA-WALIA N, STREBLOW DN, NARANATT P P, CHANDRAN B (2006) Focal adhesion kinase is critical for entry of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus into target cells. *Journal of Virology*, 80, 1167–1180.
- KUBOTA N, WADA K, ITO Y, SHIMOYAMA Y, NAKAMURA S, NISHIYAMA Y, KIMURA H (2008) One-step multiplex real-time PCR assay to analyse the latency patterns of Epstein-Barr virus infection. *J. Virol Methods*, 147, 26-36.
- KUMAR S, STECHER G, and TAMURA K (2016) Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874.
- KUPER H, ADAMI HO, TRICHOPOULOS DJ (2000) Infections as a major preventable cause of human cancer. *Intern Med*, 248, 171-83.
- KUPFERSCHMIDT K (2018) A call to arms against the other retrovirus. *Science*, 360, 844.
- KURAMITSU M, SEKIZUKA T, YAMOCHI T, FIROUZI S, SATO T, UMEKI K, SASAKI D, HASEGAWA H, KUBOTA R, SOBATA R, MATSUMOTO C, KANEKO N, MOMOSE

- H, ARAKI K, SAITO M, NOSAKA K, UTSUNOMIYA A, KOH KR, OGATA M, UCHIMARU K, IWANAGA M, SAGARA Y, YAMANO Y, OKAYAMA A, MIURA K, SATAKE M, SAITO S, ITABASHI K, YAMAGUCHI K, KURODA M, WATANABE T, OKUMA K, HAMAGUCHI I (2017) Proviral Features of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 in Carriers with Indeterminate Western Blot Analysis Results. *J Clin Microbiol*, 55, 2838-2849.
- KUTLUK T (2006) Çocukluk Çağı Kanserlerinin Epidemiyolojisi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, 49, 11-15.
- KUTOK J L, WANG F (2006) Spectrum of Epstein –Barr virus associated diseases. *Annual Review of Pathology*, 1, 375-404.
- LALLEMAND F, DESIRE N, ROZENBAUM W, NICOLAS JC, MARECHAL V (2000) Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *Clin Microbiol*, 38, 1404-8.
- LAMBERT S, BOUTTIER M, VASSY R, SEIGNEURET M, PETROW-SADOWSKI C, JANVIER S, HEVEKER N, RUSCETTI FW, PERRET G, JONES KS, PIQUE C (2009) HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood*, 113, 5176-85.
- LE BLANC I, GRANGE MP, DELAMARRE L, ROSENBERG AR, BLOT V, PIQUE C, DOKHÉLAR MC (2001) HTLV-1 structural proteins. *Virus Res*, 78, 5-16.
- LENZMEIER BA, GIEBLER HA, NYBORG JK (1998) Human T-cell leukemia virus type 1 Tax requires direct access to DNA for recruitment of CREB binding protein to the viral promoter. *Mol Cell Biol*, 18, 721-31.
- LI HC, BIGGAR RJ, MILEY WJ, MALONEY EM, CRANSTON B, HANCHARD B, HISADA M (2004) Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J Infect Dis*, 190, 1275-8.
- LIN SJ, CHEN PW, LUO WY, YEH TH, WANG HW, CHEN CJ, TSAI CH (2009) EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines. *Blood*, 114, 109-18.
- LONGO DL, GELMANN EP, COSSMAN J, YOUNG RA, GALLO RC, O'BRIEN SJ, MATIS LA (1984) Isolation of HTLV-transformed B-lymphocyte clone from a patient with HTLV-associated adult T-cell leukaemia. *Nature*, 310, 505-6.
- LUAN SL, BOULANGER E, YE H, CHANUDET E, JOHNSON N, HAMOUDI RA, BACON CM, LIU H, HUANG Y, SAID J, CHU P, CLEMEN CS, CESARMAN E, CHADBURN A, ISAACSON PG, DU MQ (2010) Primary effusion lymphoma: genomic profiling revealed amplification of SELPLG and CORO1C encoding for proteins important for cell migration. *J Pathol*, 222, 166-79.

- MACKAY J, JEMAL A, LEE NC, PARKIN DM (2006) The history of cancer. The Cancer Atlas, 1st ed. *American Cancer Society*.
- MACLACHLAN NJ, DUBOVI EJ (2011) Fenner's Veterinary Virology. 4th ed. Oxford, Academic Press, Elsevier.
- MAHZOUNIEH M, GHORANI M, KARIMI A, POURGHEYSARI B, NIKOOZAD R (2015) Prevalence of Human T-Lymphotropic Virus Types I and II in Patients With Hematological Disorders in Isfahan, Iran. *Jundishapur J Microbiol*, 8, 17201.
- MANEL N, KIM FJ, KINET S, TAYLOR N, SITBON M, BATTINI JL (2003) The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*, 115, 449-59.
- MANNS, A, WILKS, R, MURPHY, EL, HAYNES, G, FIGUEROA, P, BARNETT, M, HANCHARD, B, BLATTNER, WA (1992) A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *International Journal of Cancer*, 51, 886- 891.
- MARTINS ML, ANDRADE RG, NÉDIR BH, BARBOSA-STANCIOLI EF (2012a) Human T-Lymphotropic Viruses (HTLV) Blood transfusion in clinical proelice cepter 10.10.5772/36333.
- MARTIN JL, MALDONADO JO, MUELLER JD, ZHANG W, MANSKY LM (2016) Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses*, 8, pii: E31.
- MARTINS JV, BAPTISTA AF, ARAÚJO ADE Q (2012b) Quality of life in patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Arq Neuropsiquiatr*, 70, 257-61.
- MATSUOKA M, JEANG K-T (2011) Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene*, 30, 1379-89.
- MESRI EA, CESARMAN E, BOSHOFF C (2010) Kaposi's sarcoma herpesvirus/ Human herpesvirus-8 (KSHV/HHV8), and the oncogenesis of Kaposi's sarcoma. *Nat Rev Cancer*, 10, 707-719.
- MILLER AD (1996) Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11407-13.
- MOCHIZUKI M, TAJIMA K, WATANABE T, YAMAGUCHI K (1994) Human T lymphotropic virus type 1 uveitis. *Br J Ophthalmol*, 78, 149-54.
- MOORE PS, BOSHOFF C, WEISS RA, CHANG Y (1996) Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*, 274, 1739-44.

- MOORE PS, CHANG Y (2003) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin? *Annual Review of Microbiology*, 57, 609–39.
- MORRIS K (2003) Cancer? In Africa? *Lancet Oncology*, 4, 5.
- MORRISON BJ, LABO N, MILEY WJ, WHITBY D (2015) Serodiagnosis for tumor viruses. *Semin Oncol*, 42, 191-206.
- MORTIMER PP, LUBAN NL, KELLEHER JF, COHEN BJ (1983) Transmission of serum parvovirus-like virus by clotting-factor concentrates. *Lancet*, 2, 482-4.
- MUELLER N, OKAYAMA A, STUVER S, TACHIBANA N (1996) Findings from the Miyazaki Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 13 Suppl 1, S2-7.
- MURRAY PR, ROSENHAL KS, KABAYASHI GS (1998) *Medical microbiology*. 3th.ed. Missorvi: Mosby, pp 446-449.
- NACIUTE M, MACIUNAITE G, MIELIAUSKAITE D, RUGIENE R, ZINKEVICIENE A, MAURICAS M, MUROVSKA M and GIRKONTAITE I (2017) Increased Numbers of CD4+CD25+ and CD8+CD25+ T-Cells in Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis with Parvovirus B19 Infection in vivo 31, 181-186.
- NAGYN, KLEING, KLEIN E (2009) To the genesis of Burkitt lymphoma: regulation of apoptosis by EBNA-1 and SAP may determine the fate of Ig-myc translocation carrying B lymphocytes. *Seminars in Cancer Biology*, 19, 407–410.
- NAKANO K, WATANABE T (2016) HTLV-1 Rex Tunes the Cellular Environment Favorable for Viral Replication. *Viruses*, 8, 58.
- NAIDES SJ (1993) Parvovirus B19 infection. *Rheum Dis Clin North Am*, 19, 457–475.
- NARANATT PP, AKULA SM, ZIEN CA, KRISHNAN HH, CHANDRAN B (2003) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: Implications for infectivity. *Journal of Virology*, 77, 1524–1539.
- NARANATT PP, KRISHNAN HH, SMITH MS, CHANDRAN B (2005) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus modulates microtubule dynamics via RhoA-GTP-diaphanous 2 signaling and utilizes the dynein motors to deliver its DNA to the nucleus. *J Virol*, 79, 1191-206.



- NAVARI M, ETEBARI M, IBRAHIMI M, LEONCINI L, PICCALUGA PP (2018) Pathobiologic Roles of Epstein-Barr Virus-Encoded MicroRNAs in Human Lymphomas. *Int J Mol Sci*, 19, pii: E1168.
- NEIPEL F, ALBRECHT J C, FLECKENSTEIN B (1998) Human herpesvirus 8 The first human rhadinovirus. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 23, 73–77.
- NICHOLS KE, HARKIN DP, LEVITZ S, KRAINER M, KOLQUIST KA, GENOVESE C, BERNARD A, FERGUSON M, ZUO L, SNYDER E, BUCKLER AJ, WISE C, ASHLEY J, LOVETT M, VALENTINE MB, LOOK AT, GERALD W, HOUSMAN DE, HABER DA (1998) Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13765-70.
- NICOT C, DUNDR M, JOHNSON JM (2004) HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat Med*, 10, 197–201.
- NOSAKA K, IWANAGA M, IMAIZUMI Y, ISHITSUKA K, ISHIZAWA K, ISHIDA Y, AMANO M, ISHIDA T, UIKE N, UTSUNOMIYA A, OHSHIMA K, KAWAI K, TANAKA J, TOKURA Y, TOBINAI K, WATANABE T, UCHIMARU K, TSUKASAKI K (2017) Epidemiological and clinical features of adult T-cell leukemia-lymphoma in Japan, 2010-2011: A nationwide survey. *Cancer Sci*, 108, 2478-2486.
- ODUMADE OA, HOGQUIST KA, BALFOUR HH Jr (2011) Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 193-209.
- OLIVEIRA MI, AFONSO AMS, CURTI SP, SILVA PE, BARBOSA TF, SILVA ER JUNIOR, FIGUEIREDO CA (2017) Genotype 1 of human parvovirus B19 in clinical cases. *Rev Assoc Med Bras*, 63, 224-228.
- ONO A, MOCHIZUKI M, YAMAGUCHI K, MIYATA N, WATANABE T (1995) Increased number of circulating HTLV-1 infected cells in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1 uveitis patients: a quantitative polymerase chain reaction study. *British Journal of Ophthalmology*, 79, 270-276.
- ORKIN S FD, LOOK T, LUX S, GINSBURG D, NATHAN D (2009) Epidemiology of Leukemia in Childhood In: C L, editor. *Oncology of Infancy and Childhood* 1.1st ed. Philadelphia: *Saunders Elsevier*, pp3-25.
- PALMERI D, MALIM MH (1996) The human T-cell leukemia virus type 1 posttranscriptional trans-activator Rex contains a nuclear export signal. *J Virol*, 70, 6442-5.
- PAN L, MILLIGAN L, MICHAELI J, CESARMAN E, KNOWLES DM (2001) Polymerase Chain Reaction Detection of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Optimized Protocols and Their Application to Myeloma. *Journal of Molecular Diagnostics*, 3, 32–38

- PANFIL AR, MARTINEZ MP, RATNER L, GREEN PL (2016) Human T-cell leukemia virus-associated malignancy. *Curr Opin Virol*, 20, 40-46.
- PANTANOWITZ L, OTIS CN, DEZUBE BJ (2010) Immunohistochemistry in Kaposi's sarcoma. *Clin Exp Dermatol*, 35, 68–72.
- PANTRY S N, MEDVECZKY PG (2009) Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication. *Seminars in Cancer Biology*, 19, 153-157.
- PERCHER F, JEANNIN P, MARTIN-LATIL S, GESSAIN A, AFONSO PV, VIDY-ROCHE A, CECCALDI PE (2016) Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses*, 8, pii: E40.
- PIRAYESHFARD L, SHARIFI Z, AMINI-KAFIABAD S, HAGHNAZARI SADAGHIANI N (2018) Phylogenetic analysis of HTLV-1 in Iranian blood donors, HIV-1 positive patients and patients with beta thalassemia. *J Med Virol*.25192.
- POIESZ BJ, RUSCETTI FW, REITZ VMS, KALYANARAMAN S, GALLO RC (1981) Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. *Nature*, 294, 268–271.
- POTTER CG, POTTER AC, HATTON CSR, CHAPEL HM, ANDERSON MJ, PATTISON JR, TYRRELL DAJ, HIGGINS PG, WILLMAN JS (1987) Parry hf, cotes pm. variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human parvovirus B19. *J Clin Invest*, 79, 1486-1492.
- PRIPUZOVA N, WANG R, TSAI S, LI B, HUNG GC, PTAK R, LO SC (2012) Development of real-time PCR array for simultaneous detection of eight human blood-borne viral pathogens. *PLoS One*, 7, 43246.
- PROIETTI FA, CARNEIRO-PROIETTI AB, CATALAN-SOARES BC, MURPHY EL (2005) Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*, 24, 6058–6068.
- PURTILO DT, CASSEL CK, YANG JP, HARPER R (1975) X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet*, 1, 935-40.
- PYÖRIÄ L, TOPPINEN M, MÄNTYLÄ E, HEDMAN L, AALTONEN LM, VIHINEN-RANTA M, ILMARINEN T, SÖDERLUND-VENNERMO M, HEDMAN K, PERDOMO MF(2017) Extinct type of human parvovirus B19 persists in tonsillar B cells. *Nat Commun*, 8, 14930.
- RADU O, PANTANOWITZ L (2013) Kaposi sarcoma. *Arch Pathol Lab Med*, 137, 289-94.
- RAGHU H, SHARMA-WALIA N, VEETIL MV, SADAGOPAN S, CHANDRAN B (2009) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent

- macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Virology*, 83, 4895–4911.
- RANKIN J S (2006) William Stewart Halsted. *Ann Surg*, 243, 418–425.
- RAPPOCCIOLO G, HENSLER HR, JAIS M, REINHART TA, PEGU A, JENKINS FJ, RINALDO CR (2008) Human herpesvirus 8 infects and replicates in primary cultures of activated B lymphocytes through DC-SIGN. *Journal of Virology*, 82, 4793–4806.
- REEDMAN BM, KLEIN G (1973) Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int J Cancer*, 11, 499-520.
- RICKINSON AB, YOUNG LS, ROWE MJ (1987) Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *Virol*, 61, 1310-7.
- ROUS P (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separatable from the tumor cells. *J Exp Med*, 13, 397-9.
- RUDANT J, MENEGAUX F, LEVERGER G, BARUCHEL A, NELKEN B, BERTRAND Y, PATTE C, PACQUEMENT H, VÉRITÉ C, ROBERT A, MICHEL G, MARGUERITTE G, GANDEMER V, HÉMON D, CLAVEL J (2007) Household exposure to pesticides and risk of childhood hematopoietic malignancies: The ESCALE study (SFCE). *Environ Health Perspect*, 115, 1787-93.
- RYAN JL, FAN H, GLASER SL, SCHICHMAN SA, RAAB-TRAUB N, GULLEY ML (2004) Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *Journal of Molecular Diagnostics*, 6, 378-85.
- SAHA A, ROBERTSON ES (2011) Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clinical Cancer Research*, 17, 3056-63.
- SATOU Y, YASUNAGA J, YOSHIDA M, MATSUOKA M (2006) HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 720–5.
- SCHAFFER G, BLUMENTHAL MJ, KATZ AA (2015) Interaction of Human Tumor Viruses with Host Cell Surface Receptors and Cell Entry. *Viruses*, 7, 2592-2617.
- SCHUURHUIS GJ, HEUSER M, FREEMAN S, BENE MC, BUCCISANO F, CLOOS J, GRIMWADE D, HAFERLACH T, HILLS RK, HOURIGAN CS, JORGENSEN JL, KERN W, LACOMBE F, MAURILLO L, PREUDHOMME C, VAN DER REIJDEN BA, THIEDE C, VENDITTI A, VYAS P, WOOD BL, WALTER RB, DÖHNER K, ROBOZ GJ,

- OSSENKOPPELE GJ (2018) Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European Leukemia. Net MRD Working Party. *Blood*, 131, 1275-1291.
- SCHUPBACH J, GALLO RC (2000) Human Retroviruses. In: *Clinical Virology Manual*. Eds. SPECTER S, HODINKA R L, YOUNG S A, ASM Press, Washington D.C. pp 513-560.
- SEHGAL S, MUJTABA S, GUPTA D, AGGARWAL R, MARWAHA RK (2010) High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. *Indian J Pathol Microbiol*, 53, 63-7.
- SEIKI M, HIKIKOSHI A, TANIGUCHI T (1985) Expression of the pX gene of HTLV-I: general splicing mechanism in the HTLV family. *Science*, 228, 1532-1534.
- SEIKI M, INOUE J, TAKEDA T (1986) Direct evidence that p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting transcriptional activator. *EMBO J*, 5, 561-565.
- SHIMOTOHNO K, WACHSMAN W, TAKAHASHI Y, GOLDE DW, MIWA M, SUGIMURA T, CHEN IS (1984) Nucleotide sequence of the 3' region of an infectious human T-cell leukemia virus type II genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 6657-61.
- SHIMOTOHNO K, TAKAHASHI Y, SHIMIZU N, GOJOBORI T, GOLDE DW, CHEN IS, MIWA M, SUGIMURA T (1985) Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 3101-5.
- SHOPE RE, HURST EW (1933) Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J Exp Med*, 58, 607-24.
- SIEGL G, CASSINOTTI P (1998) Parvoviruses in Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Volume 1 Virology Mahy BWJ, *Collier L.9 ed. Arnold*, New York, pp 261-279.
- SIEMER D, KURTH J, LANG S, LEHNERDT G, STANELLE J, KUPPERS R (2008) EBV transformation overrides gene expression patterns of B cell differentiation stages. *Mol Immunol*, 45, 3133-41.
- SILVERMAN LB ACUTE S (2009) Lenfoplastik Leukemia In. Okin SH, Fisher DE, Look AT, Lux SE Ginsburg D, Nathan DG, editors. *Oncology of infancy and childhood*. Philadelphia: sunders, pp 297-331.
- SILVERMAN LR, PHIPPS AJ, MONTGOMERY A (2004) Human T-cell lymphotropicvirus type 1 open reading frame II-encoded p30II is required for in vivo replication: evidence of in vivo reversion. *J Virol*, 78, 3837-3845.

- SITAS F, NEWTON R(2001) Kaposi's sarcoma in South Africa. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 28, 1–4.
- SODJA I, MRAZOVA M, SMELHAUSOVA S (1995) Seroprevalance of IgG antibodies against parvovirus B19 in the population of the Czech Republic. *Epidemiol Microbiol Immunol*, 44, 171-4.
- SODROSKI J, ROSEN C, WONG-STAAAL F, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M, ARYA S, GALLO RC, HASELTINE WA (1985a) Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science*, 227, 171-3.
- SODROSKI JG, ROSEN CA, HASELTINE WA (1984) Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science*, 225, 381–385.
- SODROSKI JG, GOH WC, ROSEN CA, SALAHUDDIN SZ, ALDOVINI A, FRANCHINI G, WONG-STAAAL F, GALLO RC, SUGAMURA K, HINUMA Y (1985b) Trans-Activation of the human T-cell leukemia virus long terminal repeat correlates with expression of the x-lor protein. *J Virol*, 55, 831-5.
- SOMMERFELT MA (1999) Retrovirus receptors. *J Gen Virol*, 80, 3046-64.
- SOULIER J, GROLLET L, OKSENHENDLER E, CACOUB P, CAZALS-HATEM D, BABINET P, D'AGAY MF, CLAUVEL JP, RAPHAEL M, DEGOS L, SIGAUX F (1995) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood*, 86, 1276–1280.
- STEHELIN D, VARMUS HE, BISHOP JM, VOGT PK (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260, 170–3.
- STELIAROVA-FOUCHER E, STILLER C, LACOUR B, KAATSCH P (2005) International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer*, 103,1457-67.
- STURZL M, ZIETZ C, MONINI P, ENSOLI B (2001) Human herpesvirus 8 and Kaposi sarcoma: relationship with the multistep concept of tumorigenesis. *Adv Cancer Res*, 81, 125-59.
- STUVER SO, TACHIBANA N, OKAYAMA A, SHIOIRI S, TSUNETOSHI Y, TSUDA K, MUELLER NE (1993) Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. *J Infect Dis*, 167, 57-65.
- ŞAHİNER F, GÜMRAL R, YİLDİZOĞLU Ü, BABAYİĞİT MA, DURMAZ A, YİĞİT N, SARAÇLI MA, KUBAR A (2014) Coexistence of Epstein-Barr virus and Parvovirus B19 in tonsillar tissue samples: quantitative measurement by real-time PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 78, 1288-93.

ŞEVİK M (2013). Onkojenik Retrovirüsler. Selçuk Tıp Dergisi 29, 1-14.

QUALLEY DF, STEWART-MAYNARD KM, WANG F, MITRA M, GORELICK RJ, ROUZINA I, WILLIAMS MC, MUSIER-FORSTH K (2010) C-terminal domain modulates the nucleic acid chaperone activity of human T-cell leukemia virus type 1 nucleocapsid protein via an electrostatic mechanism. *J. Biol*, 285, 295-307

TAGAWA T, ALBANESE M, BOUVET M, MOOSMANN A, MAUTNER J, HEISSMEYER V, ZIELINSKI C, LUTTER D, HOSER J, HASTREITER M, HAYES M, SUGDEN B, and SCHMIDT WH (2016) Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing. *JEM*, 213, 2065–2080.

TAKATSUKI K (2005) Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology*, 2, 16

TALBOT SJ, CRAWFORD D (2004) Viruses and tumours--an update. *Eur J Cancer*, 40, 1998-2005.

TAMER D (2006) Epstein-Barr Virüs (EBV) Genomunun Periferik Kandan PCR ve Real-Time PCR İle Gösterilmesi ve Tiplendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi

TAMURA K, NEI M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.

TAMURA K, NEI M, KUMAR S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 11030-11035.

TATLI DOĞAN H, KILIÇARSLAN A, DOĞAN M, SÜNGÜ N, GÜLER TEZEL G, GÜLER G (2016) Retrospective analysis of oncogenic human papilloma virus and Epstein-Barr virus prevalence in Turkish nasopharyngeal cancer patients. *Pathol Res Pract*, 212, 1021-1026.

TELENTI A, MARSHALL WF, SMITH TF (1990) Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 28, 2187-90.

TEMİN HM, MIZUTANI S (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211–3.

TEMİN HM (1980) Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell*, 21, 599-600.

TONBAK S, ÖZDARENDELİ A, BOLAT Y (2003) Sığır Vebası Virüsü Rbok Aşı Suşu Nükleoprotein (Np) Geninin Açıklanması. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 17, 81-85.

- TOPPINEN M, NORJA P, AALTONEN LM, WESSBERG S, HEDMAN L, SÖDERLUND-VENERMO M, HEDMAN K (2015) A new quantitative PCR for human parvovirus B19 genotypes. *J Virol Methods*, 15, 218, 40-5.
- TSAI SC, LIN SJ, CHEN PW, LUO WY, YEH TH, WANG HW, CHEN CJ, TSAI CH. (2009) EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines. *Blood*, 114, 109-18.
- TSAI SC, LIN SJ, CHEN PW, LUO WY, YEH TH, WANG HW, CHEN CJ, FAGIN TU, NERBAS L, VOGL B, JABS WJ (2017) Analysis of BZLF1 mRNA detection in saliva as a marker for active replication of Epstein-Barr virus. *Journal of Virological Methods*, 244, 11-16.
- VAN ELSACKER-NIELE AM, KROES AC (1999) Human parvovirus B19: relevance in internal medicine. *Neth J Med*, 54, 221-30.
- VAN TIENEN C, VISSER O, LUGTENBURG P, TAYLOR G, COOK L (2018) Overrepresentation of patients from HTLV-1 endemic countries among T cell Non-Hodgkin lymphomas in the Netherlands: an indication of under-diagnosis of Adult T cell leukaemia/lymphoma. *Br J Haematol*, 15160.
- VEETIL MV, SHARMA-WALIA N, SADAGOPAN S, RAGHU H, SIVAKUMAR R, NARANATT PP, CHANDRAN B (2006) RhoA-GTPase facilitates entry of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus into adherent target cells in a Src-dependent manner. *Journal of Virology*, 80, 11432–11446.
- VEETIL MV, BANDYOPADHYAY C, DUTTA D, CHANDRAN B (2014) Interaction of KSHV with host cell surface receptors and cell entry. *Viruses*, 6, 4024-46.
- WALKER L R, HUSSEIN H A, AKULA S M (2014) Disintegrin-like domain of glycoprotein B regulates Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of cells. *Journal of General Virology*, 95, 1770–1782.
- WANG FZ, AKULA SM, SHARMA-WALIA N, ZENG L, CHANDRAN B (2003) Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein B mediates cell adhesion via its RGD sequence. *J Virol*, 77, 3131-47.
- WATERS A, OLIVEIRA AL, COUGHLAN S, DE VENECIA C, SCHOR D, LEITE AC, ARAÚJO AQ, HALL WW (2011) Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. *Journal of Clinical Virology*, 52, 38-44.
- WEINSTEIN HJ, HUDSON MM, LINK MP (2007) *Pediatric Lymphomas*, Springer, New York, ABD.

- WEISS SW, GOLDBLUM JR (2001) Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. 4. baskı. St Louis: Mosby, pp 917-54.
- WEN KW, DAMANIA B (2010) Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett*, 289, 140-50.
- WHITE DO, FENNER FJ (1986) Medical Virology. Third Edition Academic Press
- WHO (2009a) Children and Cancer. Erişim: [<http://www.who.int/ceh/capacity/cancer.pdf>] Erişim tarihi: 29.05.2018
- WHO (2009b) Incidence of Childhood Leukemia. Fact Sheet 4.1, code: RPG4\_Rad\_E1.
- WILLIAMS G M (1992) DNA reactive and epigenetic carcinogenes. *Experimental and Toxicology Pathology*, 44, 457-64.
- WILLIAMS GM (2001) Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, 166, 3-10.
- YAMAGIWA K, ICHIKAWA K (1917) Experimental Study of the pathogenesis of carcinoma. *The Journal of Cancer Research*, 3, 1-29.
- YARKIN F (1999) İnsan parvovirusları. Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş kitapevi, Ankara, s 791-6.
- YE J, SILVERMAN L, LAIRMORE MD (2003) HTLV-1 Rex is required for viral spread and persistence in vivo but is dispensable for cellular immortalization in vitro *Blood*, 102, 3963-9.
- YENER B (2001) Kan donörlerinde human parvovirüs B19 viremisi, prevalans çalışması T.C Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi İstanbul.
- YOSHIDA M, MIYOSHI I, HINUMA Y (1982) Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 2031-2035.
- YOSHIDA M (1987) Expression of the HTLV-1 genome and its association with a unique T-cell malignancy. *Biochim BiophysActa*, 907, 145-61.
- YOSHIKURA H, NISHIDA J, YOSHIDA M, KITAMURA Y, TAKAKU F, IKEDA S (1984) Isolation of HTLV derived from Japanese adult T-cell leukemia patients in human diploid



fibroblast strain IMR90 and the biological characters of the infected cells. *Int J Cancer*, 33, 745-9.

ZHAO LJ, GIAM CZ (1991) Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator Tax with cellular factors that bind specifically to the 21-base-pair repeats in the HTLV-I enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 11445–11449.

ZHAO LJ, GIAM CZ (1992) Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 7070-4.

ZIKIDOU P, GRAPSA A, BEZIRGIANNIDOU Z, CHATZIMICHAEL A, MANTADAKIS E (2018) Parvovirus B19-triggered Acute Hemolytic Anemia and Thrombocytopenia in a Child with Evans Syndrome. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 10, 2018018.



# ÖZGEÇMİŞ

## I. Bireysel Bilgiler

**Adı:** Yasin

**Soyadı:** Köksal

**Doğum Yeri ve Tarihi:** MALATYA/1977

**Uyruğu:** Türkiye Cumhuriyeti

**Medeni Durumu:** Evli

**Adres:** Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji E.A.H

**Telefon:** 05053114982

**E-posta:** yasinkoksal\_44@hotmail.com

## II. Eğitimi

1997-1999: İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu  
Tıbbi Laboratuvar

2002-2006: Eskişehir Anadolu Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi  
Kamu Yönetimi

2010-2014: Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü

## III. Mesleki Deneyim

2002-2004: Bursa Şevket Yılmaz Hastanesi Acil Laboratuvarı

2004-2006: İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya  
Laboratuvarı

2006-2007: Dışkapı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

2007-2009: Dışkapı Çocuk Hastanesi Kan Merkezi

2009-halen: Dışkapı Çocuk Hastanesi Kök Hücre Laboratuvarı

#### IV. Bildiriler ve Yayınlar

1. **Köksal Y**, Çağlı A, Canal E, Tavil E.B, Azık MF, Emir S, Yaralı H.N, Çulha K.V, Uçkan D, Tunç B, Kara A. Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Lökoferez ve Periferik Kök Hücre Aferezi ilk Verileri 5.Ulusal Hemaferaz kongresi (K.K.T.C) 23-26 Eylül 2010.
2. **Köksal Y**, Canal E, Demir A, Coşkun Z, Kara A, Uçkan D, Tunç B, Özgüner HM. Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kök Hücre laboratuvarı Hematopoetik Kök Hücre Çalışmaları İlk Deneyimler 5.Ulusal Hemaferaz Kongresi (K.K.T.C) 23-26 Eylül 2010
3. Özgüner M, **Köksal Y**, Canal E, Uçkan D, Tunç B. Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kök Hücre laboratuvarı Mezenkimal Kök Hücre Çalışmaları İlk Deneyimler, 8.Ulusal Pediatrik Hematoloji Kongresi Adana 25-28 Mayıs 2011
4. Özgüner M, Canal E, **Köksal Y**, Uçkan Çetinkaya D, Tunç B Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kök Hücre Laboratuvarında yapılan majör kan grubu uygunsuz kemik iliği nakil ürününde eritrosit depleyonu. 8.Ulusal Pediatrik hematoloji Kongresi Adana 25-28 Mayıs 2011
5. Özgüner M, Bayram C, Azık F, Tavil B, **Köksal Y**, Canal E, Erkoçoglu M, Uçkan D, Tunç p. Pediatrik allojenik kemik iliği naklinde in vitro colony forming unit (CFU) assay-engraftman ilişkisi 7 Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi Antalya 8-10 Mart 2012
6. Bozkaya İÖ, **Köksal Y**, Azık MF, Tavil B, Aksu T, Özgüner M, Tunç B, Uçkan Çetinkaya D. Sağlıklı kemik iliği donörlerinde granülosit koloni stimüle faktörün mezenkimal kök hücre kaynaklı immun modülatör sitokinlere etkisi 9.Ulusal Pediatrik Hematoloji Kongresi Van 24-28 Mayıs 2013

7. Aksu T, **Köksal Y**, Bozkaya İO, Karakurt N, Çulha VK, Azık MF, Tavil B, Yaralı N, Özgüner M, Uçkan Çetinkaya D. Sağlıklı kemik iliği donörlerinde granülosit koloni stimüle faktörün mezenkimal kök hücre toll-like reseptör sunumuna etkisi. 9.Ulusal Pediatrik Hematoloji Kongresi Van 24-28 Mayıs 2013
8. Özgüner M, **Köksal Y**, Işık P, Azık MF, Tunç B Ekstrakorporeal fotoferes (ECP) işlem etkinliğinin değerlendirilmesinde yeni bir öneri: T-hücre aktivasyon testi 8.Ulusal Aferez Kongresi 5-8 2013 K.K.T.C
9. Seda Turgut, Abdurrahman Kara, Adnan Çalgı, Hacı Ahmet Demir, Suna Emir, **Köksal Y**, Bahattin Tunç Allojenik Periferik Kök Hücre Afarezi sonuçları ve komplikasyonları tek merkez deneyimi 8.ulusal aferez kongresi 5-8 2013 K.K.T.T
10. Özgüner M, Azık MF, Bozkaya İO, **Köksal Y**, Canal E, Tunç B. Do two different stem cell grafts: G-CSF stimulated and unstimulated bone marrow differ according to hematopoietic colony forming capacity? 14 th International Congress of World Apheresis Society, İstanbul, Turkey september 13-15 2012
11. Namık Yaşar Özbek, İkbal Ok Bozkaya, **Köksal Y**, Meltem Özgüner Hematopoetik kök hücrelerin abo uyumlu ve uyumsuz plazma içeren ortamda koloni oluşturma kapasiteleri. 3-5 Mart 2016 9.Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi.
12. Meltem Özgüner, İkbal Ok Bozkaya, Pamir Işık, **Köksal Y**, Fatma Karaca Kara, Bahattin Tunç, Namık Özbek; Periferik kan ve kemik iliği kaynaklı hematopoetik kök hücrelerin biyolojik potansiyellerinin karşılaştırılması 3-5 Mart 2016 9. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi. Belek/ANTALYA
13. Namık Yaşar Özbek, İkbal Ok Bozkaya, Pamir Işık, **Köksal Y**, Fatma Karaca Kara, Bahattin Tunç, Meltem Özgüner. Allojenik hematopoetik kök hücre naklinde vericiye 2 veya 3 gün G-CSF uygulanmasının kök hücre sayısına etkisi 3-5 Mart 2016 9.Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi.

14. Ilkay Pişkin, Tuba Özdemir, **Köksal Y**, Fatma Karaca Kara, Neşe Yaralı Meltem Özgüner Comparison of immunological properties of mononuclear cells between acute myeloid leukemia patients and healthy donors. 19-22 June 15. International Congress of histochemistry and Cytochemistry. ICHC 2016 İstanbul.
15. Ilkay Pişkin, Tuba Özdemir, **Köksal Y**, Hilal Göktürk, Sevil Çaylı, Meltem Özgüner Çocukluk çağı akut miyeloid lösemilerinde kemik iliğinden köken alan mezenchimal stromal hücrelerin biyolojik immünolojik özellikleri XIII. Uluslar Arası Katılımlı Ulusal Histoloji Embriyoloji Kongresi THED 2016 Çeşme/İZMİR.
16. Nurettin Okur, Orhan Gürsel, Tekin Aksu, Habibe Meltem Özgüner, **Yasin Köksal**, Yaşar Namık Özbek; Ağır gastrointestinal sistem graft versus host hastalığı tedavisinde fotoferez tedavisi. 11. ulusal pediatrik hematoloji kongresi 04-07-2017
17. Merve Maze Zabun, **Yasin Köksal**, Bülent Çelik, Habibe Meltem Özgüner, Namık Yaşar Özbek. Demir ve vitamin b12 eksikliğinin periferik kandaki koloni oluşturma kapasitesi üzerindeki etkisi. 11. ulusal pediatrik hematoloji kongresi 04-07-2017.
18. Özgüner M, Azık MF, Tavil B, Bozkaya İO, **Köksal Y**, Canal E, Uçkan D, Tunç B. Do two different stem cell grafts: G-CSF stimulated and unstimulated bone marrow differ according to hematopoietic colony forming capacity? Transfusion and Apheresis Science 14 Marc 2013
19. Meltem Özgüner, Betül Tavil, **Yasin Köksal**, Elif Canal, İkbal Ok Bozkaya, Bahattin Tunç Comparison of colony forming unit-assay results of different hematopoietic stem cell sources Turkish Journal of Pediatric Disease 5(4):197-201, 2011
20. Suna Emir, Ahmet Demir, Abdurrahman Kara, **Yasin Köksal**, Meltem Özgüner, Derya Özyörük, Namık Özbek Our experience of mobilization and collection of Peripheral Blood Stem cells for autologous transplantation in children with high risk Solid Tumors and Lymphomas. EBMT15-ABS-2280.
21. İkbal Ok Bozkaya, Fatih Azık, Betül Tavil, **Yasin Köksal**, Meltem Özgüner Bahattin Tunç, Duygu Uçkan Cetinkaya The Effect of Granulocyte Colony Stimulating Factor on

Immune-Modulatory Cytokines in the Bone Marrow Microenvironment and Mesenchymal Stem Cells of Healthy Donors; Biology of Blood and Marrow Transplantation ASBMT Biol Blood Marrow Transplant 21 (2015) 1888e1894.

22. Neslihan Karakurt MD, Tekin Aksu MD, **Yasin Köksal**, Nese Yarali MD, Bahattin Tunc MD, Duygu Uckan-Cetinkaya MD & Meltem Ozguner MD. Angiopoietins in the bone marrow microenvironment of acute lymphoblastic Leukemia Hematology ISSN: 1024-5332 (Print) 1607-8454 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/yhem20>

## **Diğer Bilgiler**

- 2007: 6 Ay süre ile Sami Ulus Çocuk Hastanesi Kan Merkezi Eğitimi ve 15 gün süre ile Kızılay Kan Merkezi Eğitimi ve Sertifikası
- 2009: 6 ay süre ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Aferez Ünitesi – Kök Hücre Toplanması, Dondurulması ve Saklanması, Teröpatik Aferez Eğitimi ve Sertifikası
- 2009: 4.Ulusal Hemaferaz Kongresi (K.K.T.C) katılım
- 2010: Hacettepe Üniversitesi Pedi-Stem ve İbn-i Sina Hastanesi Aferez Ünitesi Hücre Kültürü Eğitimi
- 2010: 5.Ulusal Hemaferaz Kongresi (K.K.T.C) katılım
- 2010: TÜBA Kök Hücre Sempozyumu
- 2010: Eskişehir 1.ulusal Mezenkimal Kök Hücre Sempozyumu
- 2010: 1.Uluslar arası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu Samsun
- 2011: TÜBA Kök Hücre Kongresi
- 2011: Erciyes University 1 st International Conference on Stem Cell Research and Applications
- 2011: Erciyes University 1 st International Workshop Stem Cell Research and Applications
- 2012: 14<sup>th</sup> International Congress of The World Apheresis Association  
7<sup>th</sup>National Congress of The Turkish Society of Apheresis
- 2013: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Semineri

- 2013: 8.Ulusal Aferez Kongresi (K.K.T.C)
- 2013: 2.Ulusal Geriatrik Hematoloji Kongresi Ankara
- 2014: 5.Ulusal Lenfoma- myeloma Kongresi Antalya Belek
- 2014: 1.Kök Hücre Üretiminde Yeni Teknikler Kursu Antalya Belek
- 2014: THED2014 (XI Histoloji ve Embiryoloji Kongresi) Kök Hücre Kursu Eğitici Görevi
- 2014: 3.Ulusal Geriatrik Hematoloji Kongresi Ankara
- 2015: 6.Ulusal Lenfoma- myeloma Kongresi Antalya Belek
- 2015: Güncel İyi Üretim Uygulamalarında(CGMP) Hücresel Tedavi Ürünleri Kalite Standartları Kursu Antalya
- 2015: 4.Ulusal Geriatrik Hematoloji Kongresi Ankara
- 2015: Ulusal Aferez Kongresi (Egitici)
- 2015: 2.Tansfüzyon Tıbbı ve Kan Bankacılığı Sempozyumu
- 2015: 2.Tansfüzyon Tıbbı ve Kan Bankacılığı Sempozyumu Kan Bankacılığı Labratuvar Kursu
- 2015: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Semineri
- 2015: TÜBA Kök Hücre Tedavilerine Güncel Yaklaşım Sempozyumu
- 2015: Accreditation of Human Tissue and Cell Establishments Certificate
- 2016: 9.Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi (Antalya)
- 2016: TÜBA 3.uluslar arası Kök Hücre Kursu 'Hematolojik Onkolojide İnovatif Hücresel Tedaviler' Kongresi (Antalya)
- 2016: 11.Ulusal aferez kongresi (İstanbul)
- 2017: 12.Ulusal aferez kongresi (İstanbul)
- 2018: Ulusal Nadir Hematolojik Hastalıklar Kongresi (K.K.T.C)