



T.C  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ TANISI KONMUŞ  
HASTALARDA İNTERFERON-ALFA ve  
TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR-ALFA  
GEN POLİMORFİZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MERAL YILMAZ

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİVAS

2011

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ TANISI KONMUŞ  
HASTALARDA İNTERFERON-ALFA ve  
TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR-ALFA  
GEN POLİMORFİZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MERAL YILMAZ

DOKTORA TEZİ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

T.C  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ TANISI KONMUŞ  
HASTALARDA İNTERFERON-ALFA ve  
TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR-ALFA  
GEN POLİMORFİZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MERAL YILMAZ

DOKTORA TEZİ




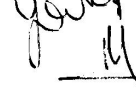

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
YRD. DOÇ. DR. İZZET YELKOVAN

SİVAS

2011

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI	
Üye	Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ	
Üye	Prof. Dr. İlhan SEZGİN	
Üye	Prof. Dr. Yasemin ÖZTOP	
Üye (Danışman)	Yrd. Doç. Dr. İzzet YELKOVAN	

ONAY

Bu tez çalışması, 15/11/2011 tarihinde Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetim kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ali Altuğ BIÇAKCI  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

***CANIM BABAMA...***

## ÖZET

### KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ TANISI KONMUŞ HASTALARDA İNERFERON-ALFA ve TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR-ALFA GEN POLİMORFİZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Meral YILMAZ

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İzzet YELKOVAN

2011, 104 sayfa

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) bir akut viral kanamalı ateştir. KKKA enfeksiyonunun klinik seyri ve sonucu insanlar arasında farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda, İnterferon-alfa 5 (IFN- $\alpha$  5), IFN- $\alpha$  10 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) gen polimorfizmlerinin KKKA için risk faktörü oluşturup oluşturmadığını, ayrıca bu polimorfizm sıklıklarının hastalığın şiddeti ve ölümcül sonucu ile ilişkili olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmada, 150 KKKA ve kontrol grubu olarak 170 sağlıklı birey incelendi. İzole edilen DNA'lar kullanılarak, IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A, IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop T>A ve TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizmlerinin genotiplemesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemleri ile yapılmıştır.

$X^2$  testi kullanılarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda, IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A, IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop T>A ve TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizm dağılımlarının hasta-kontrol grupları; ölen-yaşayan hastalar ve ağır-hafif olgular arasında anlamlı bir farklılık göstermediği bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Bununla birlikte, IFN- $\alpha$  10 TA genotipine sahip ölen KKKA hastalarının yaşayan hastalardan 2.4 kat daha fazla riske sahip oldukları bulunmuştur (*Fisher's exact testi*,  $p:0.07$ ; %95 CI: 0.93-6.58). Ayrıca, TNF- $\alpha$  -308 AA genotipine sahip hasta grubunun kontrol grubundan 3.4 kat daha fazla riske sahip olduğu (*Fisher's exact testi*,  $p:0.34$ ; %95 CI: 0.35-33.2); TNF- $\alpha$  -308 GA genotipine sahip ölen KKKA hastalarının yaşayan hastalardan 2.6 kat daha fazla riske sahip oldukları bulunmuştur (*Fisher's exact testi*,  $p:0.09$ ; %95 CI: 0.89-7.82). Biz, TNF- $\alpha$  -308 GA+AA genotipine sahip ölen KKKA hastalarının yaşayan hastalardan 2.2 kat

daha fazla riske sahip olduklarında bulunduk (*Fisher's exact testi*, p:0.12; %95 CI: 0.78-6.66).

Ağır ve ölen hasta sayısının az olması bu çalışmayı kısıtlamaktadır. Bununla birlikte, bulgularımız bu polimorfizmlerin KKKA hastalığının klinik seyrinde önemli olduğunu ileri sürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kırım-Kongo kanamalı ateşi, İnterferon- $\alpha$ , tümör nekroz faktör- $\alpha$ , polimorfizm



## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF INTERFERON-ALPHA AND TUMOUR NECROSIS FACTOR-ALPHA GENES POLYMORPHISMS IN PATIENTS DIAGNOSED WITH CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER

Meral YILMAZ

PhD Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Assist. Prof. Izzet YELKOVAN

2011,104 pages

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is an acute viral hemorrhagic fever. The clinical course and outcome of the CCHF infection are different in humans.

In our study, we aimed to investigate whether polymorphisms of interferon alpha 5 (IFN- $\alpha$  5) and interferon alpha 10 (IFN- $\alpha$  10) and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) genes are risk factors for CCHF. In addition we have also investigated whether the frequencies of these polymorphisms were related to the severity or fatality of CCHF disease.

In this study, 150 patients with CCHF and 170 healthy as a control group are examined. Genotyping of IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A and IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) and TNF- $\alpha$  -308 G>A polymorphisms has been performed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction ve Restriction Fragment Length Polymorphism) methods using isolated DNA.

In statistical analyses using  $\chi^2$  test, we observed that distribution of IFN- $\alpha$  5 - 2529 T>A and IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop and TNF- $\alpha$  -308 polymorphisms between case and control groups, fatal and non-fatal patients and severe and mild cases were not significantly different ( $p>0.05$ ). However, it has been found that individuals with IFN- $\alpha$  10 TA genotype have 2.4 times more risk for in the fatal CCHF patients than non-fatal patients (*Fisher's exact test*,  $p:0.07$ ; %95 CI: 0.93-6.58). In addition, it has been found that individuals with TNF- $\alpha$  -308 AA genotype have 3.4 times more risk for in the CCHF patients than control group (*Fisher's exact test*,  $p:0.34$ ; %95 CI: 0.35-33.2). The individuals with TNF- $\alpha$  -308 GA genotype have been found to have 2.6 times more risk

for in the fatal CCHF patients than non-fatal patients (*Fisher's exact test*, p:0.09; %95 CI: 0.89-7.82). We also found that the patients with TNF- $\alpha$  -308 GA plus AA genotypes have 2.2 times more risk for in the fatal CCHF patients than non-fatal patients (*Fisher's exact test*, p:0.12; %95 CI: 0.78-6.66).

The limitation of this study was having a small number of severe and fatal patients. Nevertheless, our findings suggest that these polymorphisms are important on clinical course of CCHF disease.

**Key words:** Crimean-Congo hemorrhagic fever, interferon- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ , polymorphism

## TEŞEKKÜR

Tez alıőmamda verdiği katkılarından ve zor dnemlerimde verdiği manevi desteklerinden dolayı danıőmanım Yrd. Do. Dr. İzzet YELKOVAN' a teőekkr ederim.

Tezimde yer alan istatistiksel değerlendirmelerde verdiği katkılarından dolayı Biyoistatistik AD. Baőkanı Prof. Dr. Hafize Sezer'e teşekkür ederim.

Maneviyatını her zaman hissettiğim ve zamansız kaybettiğim ağabeyim İsmail Hakkı Yılmaz'a zorlukları baőarabileceđime benden çok inandığı için, sevgili ablam Neriman Yılmaz'a yüreğimin yanında atan bir yürek daha olduğunu hissettirdiği ve yaptığı tüm fedakarlıklar için, kardeőlerim Mustafa Kemal Yılmaz ve Nermin Yılmaz'a bana inandıkları ve yanımda oldukları için, sıkıntılarımı paylaőan ve varolmamı sağlayan sevgili annem Zeynep YILMAZ'a ve bugün yanımda olmasını ve baőarımı görmesini en çok istediğim canım babam Cafer YILMAZ'a nasıl bir insan olmam gerektiğini, bana kendi kimliğiyle öğrettiği için sonsuz teőekkürler...

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi.....	4
2.1.1. Kırım-Kongo kanamalı ateşi ve viral kanamalı ateş tanımı.....	4
2.1.2. Tarihçesi.....	4
2.1.3. Etken.....	5
2.1.3.1. Virüsün yapısı ve moleküler biyolojisi.....	5
2.1.4. Vektör ve konakçılar.....	6
2.1.5.1. Hastalığın ve virüsün epidemiyoloji ve ekolojisi.....	7
2.1.5.2. Türkiye’de görülen epidemiler.....	9
2.1.6. Hastalık insidansı ve mortalite oranı.....	9
2.1.7. Hastalığın patogenezi.....	10
2.1.8. Hastalığın teşhisi.....	12
2.1.8.1.1. Ağır olgu tanımı.....	13
2.1.9. Tedavi.....	14
2.1.10. Korunma ve kontrol.....	14
2.2. Sitokinler.....	15
2.2.1. Sitokinlerin tanımı ve işlevleri.....	15
2.2.2. Sitokinlerin sınıflandırılması.....	16
2.2.3. İnterferonlar (IFN).....	17
2.2.4. İnterferonların KKKK patogenezi ve KKKAV’nin interferonlardan kaçma mekanizmaları.....	20
2.2.5. İnterferon gen ailesi.....	21
2.2.6. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ).....	21
2.2.7. KKKK patogenezi ve TNF- $\alpha$ ’nın yeri.....	23
2.3. Polimorfizm ve tanımı.....	24
2.3.1. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP).....	25
2.3.2. Genetik Polimorfizmin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	25
2.3.2.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	26
2.3.2.2. İnterferon-alfa alt tiplerinin gen polimorfizmleri ve diğer hastalıklarla ilişkileri.....	27
2.3.2.3. TNF- $\alpha$ gen polimorfizmi ve diğer hastalıklarla ilişkisi.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Kullanılan cihazlar.....	33
3.2. Kullanılan poliprolen malzemeler.....	33
3.3. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	33

3.4.	Kullanılan solüsyonlar ve tamponlar.....	34
3.4.1.	TE tamponu.....	34
3.4.2.	TAE tamponu.....	35
3.4.3.	%30 Akrilamid solüsyonu.....	35
3.4.4.	5X TBE tamponu.....	35
3.4.5.	%10 Amonyum persülfat.....	35
3.4.6.	Yükleme tamponu.....	35
3.4.7.	dNTP çalışma solüsyonu.....	35
3.4.8.	Primer stoklarının hazırlanması.....	35
3.5.	Çalışma grubu.....	36
3.5.1.	Hasta grubu.....	36
3.5.2.	Kontrol grubu.....	36
3.6.	Örneklerin alınması.....	37
3.7.	Kan örneklerinden DNA eldesi.....	37
3.8.	Genotipleme.....	38
3.8.1.	Restriksiyon enzimleri ile yapılan tepkime karışımlarının hazırlanması.....	38
3.9.	Jel elektroforezi.....	41
3.9.1.	Agaroz jelin hazırlanması.....	41
3.9.2.	Agaroz jelde PCR ve RFLP ürünlerinin koşturulması.....	41
3.9.3.	Denature olmayan poliakrilamid jelin hazırlanması.....	41
3.9.4.	Örneklerin poliakrilamid jele yüklenmesi, yürütülmesi ve boyanması.....	42
4.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	42
5.	BULGULAR.....	43
5.1.	Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin demografik özelliklerinin değerlendirilmesi.....	43
5.2.	PCR ve RFLP ürünlerin genotiplerinin değerlendirmesi.....	47
5.2.1.	IFN- $\alpha$ 5 -2529 T>A polimorfizmi.....	47
5.2.2.	IFN- $\alpha$ 10 Cys20>stop (T>A) polimorfizmi.....	47
5.2.3.	TNF- $\alpha$ -308G>A polimorfizmi.....	48
5.3.	Genotip dağılımlarının istatistiksel değerlendirmesi ve risk oranlarının belirlenmesi.....	49
5.3.1.	IFN- $\alpha$ 5 -2529 T>A polimorfizmi için.....	49
5.3.2.	IFN- $\alpha$ 10 Cys20>stop (T>A) polimorfizmi için.....	50
5.3.3.	TNF- $\alpha$ -308G>A polimorfizmi için.....	52
6.	TARTIŞMA.....	57
7.	SONUÇLAR.....	68
8.	KAYNAKLAR.....	70
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	80
10.	EKLER.....	81

10.1.	Ek-1: Etik kurul kararı (2007).....	81
10.2.	Ek-2: Etik kurul kararı (2010).....	82
10.3.	Ek-3: Bilgilendirilmiş olur formu.....	83
10.4.	Ek-4: Hemorrajik fever tanısı ile takip edilen hastalara ait takip formu.....	85
10.5.	Ek-5: Kontrol grubu takip formu.....	87

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Bir <i>Bünyaviridae</i> virionunun çapraz kesiti (Whitehouse CA. 2004).....	6
Şekil 2.2	Tip I IFN uyarımı, sinyal oluşumu ve işlevi (Weber F. 2008).....	18
Şekil 2.3	TNF geni üzerindeki polimorfik bölgeler ( <a href="http://genomebiology.com">http://genomebiology.com</a> ) .....	30
Şekil 5.1	PCR ve RFLP ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.....	48
Şekil5.2	PCR ve RFLP ürünlerinin denature olamayan poliakrilamid jel görüntüleri.....	49

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	1945-2006 yılları arasında rapor edilmiş KKKA salgınları (Ergönül Ö. 2006) .....	8
Çizelge 2.2	Yıllara göre Türkiye’de görülen KKKA salgınlarında tespit edilen hasta ve ölen birey sayısı (Yılmaz GR. 2009) .....	9
Çizelge 2.3	Swanepoel ve arkadaşlarının şiddetli olgu tanımlamada kullandığı laboratuvar bulguları (Ergönül Ö. 2007).....	13
Çizelge 2.4	Sitokinlerin başlıca fonksiyonlarına göre gruplandırılması (Aydıntup O. 1997).....	16
Çizelge 2.5	Interferon aile üyeleri.....	19
Çizelge 2.6	TNF- $\alpha$ gen polimorfizmleri ve enfeksiyon hastalıkları ile ilişkisi (Qidiwai T. 2011).....	32
Çizelge 3.1	Gen polimorfizmleri için PCR tepkime karışımı.....	39
Çizelge 3.2	Gen polimorfizmleri için PCR tepkime koşulları.....	39
Çizelge 3.3	PCR tepkimesinde kullanılan primer dizileri, primerlerin yapışma sıcaklıkları ve DNA parça uzunluklarının gösterimi.	40
Çizelge 3.4	RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve RFLP sonrası DNA parça uzunluklarının gösterimi.....	40
Çizelge 5.1	KKKA hastaları ve kontrol grubuna ait demografik özelliklerinin karşılaştırılması.....	44
Çizelge 5.2	Yaşayan-ölen ve ağır-hafif KKKA hastalarında görülen laboratuvar bulgularının ortalamalarının karşılaştırılması.....	45
Çizelge 5.3	Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri.....	54
Çizelge 5.4	Yaşayan ve ölen hasta grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri.....	55
Çizelge 5.5	Ağır ve hafif olgu grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri.....	56



## KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	Alanin aminotransferaz
aPTT	Aktive parsiyel trombin time
AST	Aspartat aminotransferaz
AT III	Antitrombin III
bç	Baz çifti
°C	Santigratderece
C5aR	C5a reseptörü
KKKAV	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
CI	Güvenlik aralığı (Confidence interval)
CÜTFAM	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi
DHF	Dengue kanamalı ateş
DC	Dendritik hücre
DIC	Yaygın damariçi pıhtılaşma
EIA	Enzim immün assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Etidum bromür
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IL	Interlökin
IL-RA	Interlökin reseptör antagonisti
INR	International normalized ratio
KKKA	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
MxA	Miksovirus resistans 1
ml	Mililitre
$\mu$ l	Mikrolitre
NK	Naturel killer
OD	Risk oranı (Odd ratio)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase chain reaction)
PRRs	Pattern-recognition reseptörler
RFLP	Resriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Resriktion fragment length polimorphism)
RT-PCR	Reverse transcriptase-Time Polymerase Chain Reaction
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TBE	Tris bazı, Borik asit, EDTA
TNF- $\alpha$	Tümör nekrozis faktör alfa
UV	Ultraviyole
VKF	Viral kanamalı ateş

## 1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları, dünyada mortalite ve morbidite oranına en büyük katkıda bulunan hastalık grubudur. Viral kanamalı ateşlerde (VKA) olduğu gibi bazı enfeksiyon hastalıkları hem genel populasyonda hem de sağlık bakımı ile ilgilenen topluluklarda büyük endişe ve ilgi uyandırmaktadır. *Lassa, Marburg, Ebola, agents of South American VHF, Hanta Virüs* ve *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus* (Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü-KKKAV) gibi bazı önemli kanamalı ateş virüsleri, insandan insana bulaş yapabilme potansiyeline sahip olmalarından dolayı, toplum sağlığı açısından, önemli sonuçlar doğurabilirler (1).

KKKAV, %10-60 mortalite oranına sahip Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) olarak bilinen, insanda şiddetli kanamalı ateşi hastalığına neden olan bir virüstür (2). Genellikle kene ısırığı ile meydana gelen KKKA hastalığının inkübasyon dönemi, kene ısırığından sonra 2-12 gün, nozokomiyal olgularda ise 3-10 (ortalama 5-6) gün arasındadır. İnkübasyonu takiben ani başlayan şiddetli baş ağrısı, ateş ve titremeler görülür. Kas ağrısı, boğaz ağrısı, fotofobi görülebilir. Kanamaların görüldüğü dönemin hemen öncesinde karın ağrısı, tekrarlayan kusmalar ve ciddi bel ağrıları klinik olarak önemli tanısal bulgulardır. Hastalığın 3-6. günlerinden sonra peteşiyel döküntüler izlenir ve genellikle burun kanaması, hematemez ve melena da görülebilmektedir. Ölüm genellikle hastalığın ikinci haftasında izlenir ve ortalama ölüm oranı % 10-30 arasındadır. Bununla birlikte ülkemizde takip edilen olgulardaki ölüm oranı % 2-12 arasındadır (3). KKKA bazı hastalarda hafif seyirli olup hastalar kısa sürede iyileşmekte, bazılarında ise ağır formda seyredip ölüm ile sonuçlanmaktadır (4).

Şimdiye kadar ne KKKA patogenezi ne de bu hastalığın prognozunun neden bazı hastalarda hafif bazı hastalarda ağır seyrettiği tam olarak açıklanamamıştır. Elde edilen verilerden, kandaki viral yük artışının hastalığın şiddeti ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, antikor yanıtların viral yük ile yüksek oranda ters ilişki gösterdiği de belirtilmiştir. 2005 yılında yapılan bir çalışmada KKKA hastalarında, viremi kontrol edilemediğinde ölümün kaçınılmaz olduğu gösterilmiştir (4, 5).

KKKAV, interferonlara duyarlı virüsler listesine eklenen en yeni hastalık ajanlarından biridir. Bununla birlikte, şimdiye kadar KKKA'inde dahil olduğu herhangi bir viral kanamalı ateş hastalığına karşı interferonların etkisi tam olarak belirlenememiştir (4). Son dönemlerde Anderson ve arkadaşları, farelere virüs

verildikten sonra uygulanan IFN tedavisine *Bunyavirus*'lerin duyarlı olmamasının nedeninin; "neden bazı insanlarda ağır hastalık tablosu gelişime eğilimi vardır" sorusunda gizli olabileceğini bildirmektedirler. Ağır hastalık olgularında, enfeksiyonla savaşta yeterli tip I interferon artışı sağlanamayabilir. Bu hastalar bir kez interferon artışını sağlayamadığında, virüs replikasyonu interferonların uyardığı antiviral yanıtın etkilenmemekte, virüs replikasyonu engellenememekte ve viral yük miktarı artmaktadır (6).

KKKA'da öncelikli patofizyolojik olaylar, endotelin hasarına bağlı eritrosit ve plazmanın dokulara sızması, beraberinde pıhtılaşma bozukluklarının ve kanamaların görülmesidir. Çeşitli çalışmalar KKKA'da görülen kanama ve pıhtılaşma bozukluklarının yüksek proinflamatuvar sitokin seviyelerinin dolaylı etkilerinden kaynaklanabileceğini gündeme getirmiştir. Dengue ve Ebola kanamalı ateşlerine benzer olarak diğer kanamalı ateşlerde, proinflamatuvar yanıtın gücü, damar hasarı ve hastalığın şiddeti arasında bir bağlantı tespit edilmiştir (4). 2005 yılında yapılan bir çalışmada KKKA hastalarında, yüksek seviyede viremi ve inflamatuvar mediatörlerin neden olduğu yüksek oranda enflamasyon ölümü getirdiği bildirilmiştir (4, 5). KKKA hastalarında günümüze kadar yapılan çalışmalarda IL6, 10 ve 12 gibi bazı interlökinlerin yanı sıra IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  düzeylerinin yüksek olduğu, özellikle ölen hastalarda yüksek TNF- $\alpha$  düzeyinin dikkat çektiği belirtilmiştir. KKKA'nın en önemli ve ölümcül özelliği, özellikle TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve muhtemelen diğer inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-12, IL-18) aşırı salınımı (sitokin fırtınası) ile fazla sayıda makrofajın birlikte aktive olmasıdır (co-activations). Kan hücrelerinin aşırı patolojik fagositozunun ağır sitopenilere, karaciğer fonksiyon bozukluklarına yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC), organ yetmezliklerine, büyük kanamalara neden olduğu ve şoku tetiklediği düşünülmektedir (7, 8, 9).

Genetik faktörler, sitokin yapımında önemli bir etkiye sahiptirler ve transkripsiyonu etkileyen sitokin gen bölgelerinde yer alan polimorfizmlerin, bireyler arası sitokin yapım miktarını değiştirebildiği, bu değişikliklerin bağışık yanıtın yetersizliğine veya gecikmesine veya aşırı sitokin salınımına neden olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca, sitokin gen polimorfizmlerinin çeşitli viral enfeksiyonların şiddetini değiştirdiği de bildirilmektedir (10, 11, 12). İnflamatuvar bir genin promoter bölgesinde olduğu varsayılan tek nükleotid polimorfizminin, (SNP) enfeksiyona yanıtta, uygun inflamatuvar

aracaların yapımını %50 artırabildiği belirtilmektedir. Ayrıca, eğer enfeksiyon meydana gelmişse, ağır inflamatuvar komplikasyonların gelişme olasılığını %25 artırabileceğide tahmin edilmektedir (13). Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda genetik değişikliklerin (mutasyon ve/veya polimorfizmler) bazı enfeksiyonlara (virüs enfeksiyonlarında dahil) yatkınlık ya da direnç oluşturduğu ve/veya enfeksiyon hastalıklarının bireyler arasında farklı klinik seyre neden olduğu bildirilmektedir (12, 13).

KKKA hastalarında viral yükün kontrol altına alınmasında tip I interferonlardan IFN- $\alpha$  ve hastalık seyrinin kötüleşmesinde TNF- $\alpha$  seviyelerinin önemli rol oynadığı göz ardı edilemez. genin ekspresyonunu etkileyebilecek sitokin genlerinin promoter bölgesinde yer alan ve/veya prematüre protein oluşumuna neden olan gen polimorfizmlerinin sitokin seviyelerinde değişikliklere neden olabileceği düşüncesinden yola çıkarak, bazı virüs enfeksiyonlarına karşı konağın oluşturduğu immün yanıtta genel olarak ortaya çıkan ana interferon türlerinden IFN- $\alpha$  5 (-2529 T>A polimorfizmi) ve IFN- $\alpha$  10 genleri (Cys20>stop polimorfizmi) ile birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan TNF- $\alpha$  gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesi ve kliniği şiddetli olan veya ölümcül seyreden KKKA olgularında normal popülasyona göre bu gen polimorfizmlerinin hastalığa yatkınlık oluşturmada ve/veya hastalığın seyrinin kötüleşmesinde bir bağlantısının olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kırım-Kongo kanamalı ateşi

#### 2.1.1. Kırım-Kongo kanamalı ateşi ve viral kanamalı ateş tanımı

Kırım Kongo kanamalı ateşi, keneler yoluyla bulaşan, insanlarda ciddi seyir gösterip, yüksek mortaliteye neden olabilen viral kanamalı bir hastalıktır. Dünyanın bazı bölgelerinde bu hastalık bir halk sağlığı problemidir (1).

Viral kanamalı ateş (VKA) terimi coğrafik olarak sınırlı çok sayıda virüs ile ilişkili hastalığı yansıtmaktadır. VKA'ler, ağır klinik seyirli olabilen, modern yoğun bakım tekniklerine rağmen mortalitesi yüksek, ateş ve şiddetli olgularda kanama ve şok ile seyreden bir enfeksiyon hastalığı grubudur. Günümüzde VKA oluşturan en az 14 farklı virus, dört farklı aile içinde sınıflandırılmıştır: *Filaviviridae* (Marburg virus ve Ebola virus), *Arenaviridae* (Lassa virus, Junin virus, Machupo virus, Sabia virus ve Guanarito virus), *Bunyaviridae* (*Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus [KKKAV]*, Rift Valley fever virus ve Hantaviruslar), *Flaviviridae* (Yellow Fever Virus, Dengue Virus, Omsk hemorrhagic fever virus ve Kyasanur forest disease virus). Son yıllarda *Flaviviridae* ailesine mensup *Alkhumra virus*'unun da VKA oluşturan etkenler arasında yer aldığı kabul edilmektedir (3, 14).

#### 2.1.2. Tarihçesi

12. yüzyılda Tacikistan olarak bilinen bölgede bir hekim tarafından idrar, rektum, dişeti, kusmuk, tükürük ve karın boşluğunda kanın varlığı ile bugün KKKK olduğu düşünülen kanamalı bir hastalık tanımı yapılmış ve bu hastalığa normalde karatavuk paraziti olan bir kene ya da bitin neden olduğu bildirilmiştir (15).

Modern çağda, ilk olarak Kırım Kanamalı Ateşi (KKA) 1944-1945'de İkinci Dünya Savaşı'nda, Kırım'da yaklaşık 200 enfekte olmuş Sovyet askerinde klinik olarak tanımlanmış ve modern tıp biliminin dikkatini çekmiştir. Antibiyotik varlığında nimfal *Hyalomma marginatum* kenelerinin nimf formlarının filtre edilen süspansiyonları ile gönüllü ve sağlıklı insanlara yapılan aşılardan 2 gün sonra, hafif KKA klinik seyrinin oluşması, hastalığın viral bir etiyolojiye sahip olduğunu ve enfeksiyonun kene ile bulaştığı şüphesini kanıtlamıştır (15, 16).

1967'de, yeni doğmuş beyaz fareler kullanılarak bu virüs izole edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, çeşitli coğrafik bölgelerden elde edilen viral suşlarının tanımlanmaları,

sınıflandırılmaları ve serolojik testler için gerekli belirteçler (antikorlar, antijenler) üretilmiştir (1, 15).

KKA'dan sorumlu bu virüsün daha sonra 1956'da Kongo Demokratik Cumhuriyeti'nde ateşli bir hastadan izole edilen Congo virüsü'ne antijenik olarak benzer olduğu gösterilmiştir. Avrasyalı KKA suşlarının ve Congo virüsü'nün Asya ve Afrikalı suşlarının bu genel antijenik yapısı, bu virüsün Crimean hemorrhagic fever-Congo virüs olarak adlandırılmasına neden olmuştur. Daha sonra bu isim *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (KKKAV) olarak değiştirilmiştir (16).

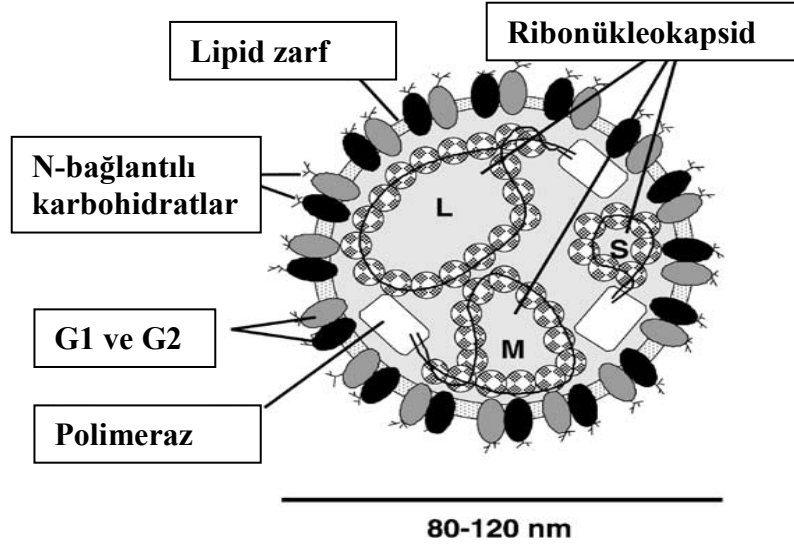
### **2.1.3. Etken**

KKKA hastalığına neden olan etken KKKAV'dür. KKKAV'ü, *Dengue Virüsü*'nden sonra tıbbi olarak önemli tüm arbovirüslerin ikinci en yaygın görülen virüs türüdür (17). Bu virüs, *Bunyaviridae* ailesine ait *Nairovirus* cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır. *Nairovirus* genusu, 7 serogrup altında gruplandırılan otuzdört virüsü kapsamaktadır. En önemli serogrup, KKKAV ve Hazara virüsü'nün (insanlar için patojenik olduğu gösterilmemiştir) yer aldığı KKKA grubudur (18, 19).

#### **2.1.3.1. Virüsün yapısı ve moleküler biyolojisi**

KKKAV, 80-120nm büyüklüğünde, *Nairovirus* cinsinin diğer tüm üyelerine benzer olarak, zarflı, küresel; üç parçalı, negatif polariteli, tek iplikli RNA içeren bir virüstür (20).

Üç genom segmenti dört yapısal protein kodlamaktadır (şekil 2.1.); L (Large) segmenti RNA-bağımlı RNA polimerazı, S (Small) segmenti, nükleokapsit proteinleri (N) ve M (Medium) segmenti glikoprotein öncülünü kodlamaktadır. Bu öncül, proteolitik bir bölünmeye uğrayarak Gn ve Gc olarak adlandırılan iki zarf glikoproteinini (aynı zamanda G1 ve G2 olarak da adlandırılmaktadırlar) meydana getirir (21, 22).



Şekil: 2.1 Bir *Bunyaviridae* virionunun çapraz kesiti (Whitehouse CA. 2004) 3 RNA segmenti (Small, Medium, Large) nükleokapsid proteini ile kompleks oluşturarak ribonükleokapsid yapıları meydana getirirler. Bu nükleokapsidler ve RNA-bağımlı RNA polimeraz, G1 ve G2 viral glikoproteinlerini içeren bir lipid zarf içerisinde paketlenmiştir.

Doğal kene-omurgalı döngüsünde önemli bir rol oynayan KKKAV'nin M RNA segmentinin kodladığı Gn ve Gc glikoproteinleri, büyük olasılıkla, omurgalı ve kene konak kullanımını, virüsün hücre tropizmini ve insan enfeksiyonları süresince virüsün patojenitesini etkilemektedir. Ayrıca bu glikoproteinler nötralize edici antikorlar için de hedef oluşturmaktadırlar (23, 24).

Viral glikoproteinler, duyarlı hücreler üzerinde yer alan reseptörleri tanımakla sorumludur. Bu reseptörleri tanıyarak hücre yüzeyine tutunmayı takiben virüs, endositozla hücre içine girer. Replikasyon sitoplazmada meydana gelir ve virionlar Golgi bölgesindeki sitoplazmik veziküller içinde endoplazmik retikulum boyunca tomurcuklanma ile olgunlaşırlar (16, 18, 24, 25).

#### 2.1.4. Vektör ve konakçılar

Ixodidae ve Argasidae ailesine bağlı 31 kene türünün virusun vektörü olabileceği bildirilmesine rağmen, günümüzde hastalığın başlıca vektörlerinin *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma marginatum rufipes* ve *Hyalomma anatolicum anatolicum* olduğu kabul edilmektedir (26, 27).

Avrupa, Asya ve Afrika'nın endemik bölgelerinde, viral enfeksiyon, sayısız evcil ve vahşi omurgalılarda, antikör yapımı veya viremi oluşumunun tespit edilmesiyle belgelendirilmiştir (28).

Sürüngen ve kuşların (devekuşu hariç) büyük çoğunluğunun enfeksiyona dirençli olduğu gösterilmiştir (15, 26).

#### **2.1.5.1. Hastalığın ve virüsün epidemiyoloji ve ekolojisi**

KKKAV, kenelerdeki transovarial-transstadial siklus ve kene-omurgalı siklusu olmak üzere iki siklus halinde varlığını sürdürür (29). Virüs, çeşitli çiftlik hayvanlarında, büyük vahşi ot oburlarda, tavşan ve kirpelerde belirtisiz enfeksiyon ve bir hafta kadar süren geçici bir viremi oluşturmaktadır. Bununla birlikte infekte hayvanlar viremik faz süresince insanlara hastalığın bulaşması için tehlike oluşturmaktadırlar (26, 29).

KKKAV sadece insanlarda ve yeni doğmuş farelerde patojendir. Bu virüs insanlara başlıca; infekte kenelerin ısırmasıyla, herhangi bir koruyucu olmadan enfekte kenelerin elle ezilmesiyle, infekte hayvanların doku veya kanları ile direk temas sonucunda, infekte hayvanların sütünün içilmesiyle ve nozokomial yolla bulaşmaktadır (28, 30). Buna bağlantılı olarak, endemik alanlarda yüksek risk grupları arasında; tarım çalışanları, hayvancılık ile uğraşanlar, mezbaha çalışanları, kasaplar, et ve et ürünleri market işçileri, kırsal kesimde yaşayanlar, veterinerler, hasta hayvan ile teması olanlar ve endemik bölgelerde görev yapan sağlık personeli, askerler, piknik veya kamp yapanlar ile deri fabrikası işçileri yer almaktadır (3, 17, 30-32). Ilıman alanlarda, KKKA olguları, kene aktivitesinin yüksek olduğu, ilkbahar ve sonbaharın başlarında ortaya çıkmasına karşın tropikal ve subtropikal alanlarda bölgesel sıcaklık ve nem oranına bağlı olarak çeşitli mevsimsel modeller gösterilmektedir. Kışın ortalarında hatta ocak ayında bile hastalığın görüldüğü rapor edilmiştir (26, 28, 33). Çoğu KKKA vakası sporadik olarak görülmesine karşın, Asya, Afrika, Ortadoğu ve Doğu Avrupa'da birçok KKKA epidemisi bildirilmiştir (çizelge 2.1) (16).



Çizelge 2.1 1945-2006 yılları arasında rapor edilmiş KKKA salgınları (16)

Coğrafik Yerleşim	Yıllar	Vaka sayısı	Ölüm Oranı (%)	Meslek grubu
<b>Güneydoğu Avrupa</b>				
Kırım	1944-1945	200	10	Ordu üyeleri
Astragan	1953-1963	104	17	Tarım işçileri
Rostov	1953-1969	323	15	Tarım işçileri
Bulgaristan	1953-1974	1105	17	Tarım işçileri ve sağlık çalışanları
	1975-1996	279	11	Tarım işçileri
	1997-2003	138	21	Tarım işçileri ve sağlık çalışanları
Arnavutluk	2001	7	-	Tarım işçileri
Kosova	2001	18	33	Tarım işçileri
Türkiye	2002-2005	1103	5	Tarım işçileri ve sağlık çalışanları
<b>Asya</b>				
Çin	1965-1994	260	21	Tarım işçileri
	1997	26	24	Tarım işçileri
Kazakistan	1948-1968	75	50	Tarım işçileri
Tacikistan	1943-1970	97	23	Tarım ve laboratuvar işçileri
Pakistan	1976	14	29	Çobanlar ve sağlık çalışanları
	1994	3	Bilinmiyor	Sağlık çalışanları
	2000	9	55	Tarım ve sağlık çalışanları
<b>Orta Doğu</b>				
Birleşik Arap Emirlikleri	1979	6	50	Sağlık çalışanları
Şarjah	1994-1995	11	73	Tarım işçileri
Irak	1980	1	-	Ambar memuru
Suidi Arabistan	1979-1980	55	64	Tarım işçileri
Umman Sultanlığı	1990	7	-	Tarım işçileri
İran	1995-1996	4	Bilinmiyor	Tarım işçileri
	2003	81	18	Tarım işçileri
<b>Afrika</b>				
Zaire(Kongo)	1956	2	-	Doktor
Uganda	1958-1977	12	8	Laboratuvar çalışanları
Moritanya	1983	1	-	Deve sürüsü sahipleri
	2004	38	29	Tarım işçileri, sağlık çalışanları
				Bilinmiyor
Burkina Faso	1983	1	-	Çiftçiler, sağlık çalışanları
Güney Afrika Cumhuriyeti	1981-1986	32	31	Öğrenci
Tanzanya	1986	1	-	Bilinmiyor
Güneybatı Afrika	1981-1986	1	-	Tarım işçisi
Kenya	2000	1	-	

### 2.1.5.2. Türkiye’de görülen epidemiler

Ülkemizde ilk defa 1980 yılında Serter tarafından Ege bölgesinde *Arbovirus*’lerin mevcut durumunu göstermeyi amaçlayan seroepidemiolojik bir çalışmada, 1074 serum örneğinde KKKAV ’ne karşı hemaglutinasyon inhibisyon testinde %9.2 oranında antikor pozitifliği saptanmıştır (34).

Türkiye’de ilk semptomatik KKKA vakası 2002 yılında rapor edilmiştir. 2003 yılında, ölümlerle birlikte seyreden, her yıl bildirilen vaka sayısında artışların görüldüğü salgınlar tespit edilmiştir (çizelge 2. 2) (35, 36).

Ergönül’ün çalışmasında 2005 yılında hastane çalışanları arasında iki nozokomial enfeksiyonun olduğunu rapor edilmiştir (37).

Çizelge 2.2 Yıllara göre Türkiye’de görülen KKKA salgınlarında tespit edilen hasta ve ölen birey sayısı (36, 37)

YIL	OLGU SAYISI	ÖLEN BİREY SAYISI
2002	17	0
2003	133	6
2004	249	13
2005	266	13
2006	438	27
2007	713	33
2008	1315	63
2009	1300	62

### 2.1.6. Hastalık insidansı ve mortalite oranı

KKKA’ da insanlar, bugüne kadar hastalığın tanımlandığı tek konakçılardır. İnfekte olanların hasta olma olasılıkları 0.215’ tir, diğer bir ifadeyle, infekte olan her beş kişiden birinde hastalık gelişmektedir. Bu hastalığın seyri, dört farklı safhada tanımlanmıştır: inkübasyon (kuluçka), kanama öncesi, kanama ve iyileşme periodları (28, 38, 39).

Ortalama ölüm oranı %20-50 arasındadır. Bu oran %70’e kadar çıkabilmektedir. Bununla birlikte ülkemizde takip edilen olgulardaki ölüm oranı %2-12 arasındadır (1, 3, 16, 38, 40, 41).

### 2.1.7. Hastalığın patogenezi

Son yıllarda yapılan araştırmalara rağmen VKA'larda olduğu gibi KKKA'nın patogenezi ne neden olan özgül mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır (42). KKKA'nın patogenezinin yeterince açıklanamamasının nedenleri: (i) enfeksiyon sporadik olarak meydana gelmektedir ve bu alanların olanakları tam otopsi yapımını sınırlamaktadır, (ii) virüs kontrolü biyogüvenlik seviyesi 4 olan (Biosafety level-4=BSL-4) laboratuarlara ihtiyaç duymaktadır, (iii) hastalığın hayvan modellerinin olmamasıdır. Bu sorunlardan dolayı, KKKA hakkında eldeki sınırlı bilgi, çoğunlukla Türkiye'deki küçük salgınlardan elde edilen materyallerin kullanılmasıyla, kan analizleriyle ve hastaların karaciğer biyopsisinden elde edilmiştir (5).

VKA'lar antiviral yanıtı başlatan hücrelere zarar vererek, konak bağışık yanıtı hasara uğratmaktadırlar. Bu hasar, lenfoid organların ve damar sisteminin bozulması ile birlikte virüsün dikkat çekici replikasyonu ile oluşmaktadır (1). Virüs konağa deriden kenenin kan emmesi sırasında verildiğinde deri ve derialtı dokuları ile bölgesel lenf dokusundaki bölgesel replikasyonu takiben kısa bir viremi ile karaciğer, lenfoid dokular, kaslar ve bağ dokusu gibi önemli organlara yayılır. Buradaki ikincil replikasyonun ardından ikincil viremi oluşturmaktadır (42, 43). Hastalığa özgül klinik tablo bu viremi süresince oluşmaktadır. VKA'larda hastalığın üstesinden gelinmesinde vireminin kontrol edilmesi önemlidir (16, 43-45). Ebola kanamalı ateşi, Lassa ateşi ve Rift Vadisi ateşi'nde olduğu gibi KKKA'da da ölüm kaçınılmazdır VKA'larda bağışıklık sistemi hastalığın iyileşme döneminde önemlidir (7, 46, 47). Özellikle KKKA'da yüksek viremi ölüm ile bağlantılı bulunmuştur (4, 44, 45). 2005 yılında Elaldı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hastaneye başvuru gününde ölen hastaların serum virüs titrelerinin yaşayanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu, ayrıca ardışık ölçümlerde ölen bireylerde, öldükleri güne kadar yüksek seyrettiği gözlemlenmiştir (4). Nitekim KKKA'da ve diğer bazı VKA'larda ölen hastalarda ve ağır olgularda bağışık yanıt bozulmuştur (48). Ebola viruslarının oluşturduğu VKA'da hastalığın ikinci haftasında hala virusa özgül antikor yanıt yok ise hastalık ölümle sonuçlanmaktadır. Yine KKKA nedeniyle ölen hastalarda antikor yanıtının yetersiz olduğu bildirilmektedir. (49, 50). Ülkemizden ve diğer ülkelerden bildirilen olgu serilerinde ölenlerde anti-KKKAV immünoglobulin M (Ig M) ve immünoglobulin G (IgG) yanıtının olmadığı gösterilmiştir (4, 51). Nötralizan antikorların serumdaki

yokluğu, virüsün serumdan ve dokulardan temizlenmesini engellemektedir. Bu engellenme, yüksek seviyede viremiye, viremi yüksek seviyede enflamasyona ve ölüme neden olmaktadır.

Viral yük ve antikor yanıt yetersizliğinin dışında, KKKA patogeneziinde, endotel hücrelerin, immün yanıtın ve pıhtılaşma yolağının önemli rolleri olduğu ifade edilmektedir (25, 53, 54).

KKKA'da virusun esas hedef hücreleri monositler, endotel hücreler ve hepatositlerdir (25). İmmünohistokimyasal ve benzeri çalışmalarda KKKA olgularının endotel hücrelerinde virüs gösterilmiştir (54). Endotelyum direk olarak virüs aracılığıyla infekte olmaktadır ve/veya sitokinlerin salınmasıyla hasara uğrar. KKKA olgularında görülen kanamaların ya endotel hasara ya da hücreler arasında endotel duvarına katkıda bulunan sıkı bağlantı (tight junction) alanlarında meydana gelen bozulmaya bağlı olarak ortaya çıkabildiği ifade edilmektedir. Bunun dışında, bu kanamaların enfeksiyonun direkt bir sonucu olup olmadığı veya virüs tarafından tetiklenen ve konağa ait faktörlerin endotelial hasara neden olup olmadığı hala netlik kazanmamıştır. Bununla birlikte, bir KKKA epitelial hücre hattı modelinde, ne sıkı bağlantı alanlarının bozulmasının ne de hücrelerde meydana gelen apoptoz veya nekrozun bu hastalıkta kanama ve pıhtılaşma bozukluklarına neden olmadığı gösterilmiştir. Buna karşın, yüksek seviyede proinflatuar sitokinlerin direk olmayan bir yolla kanama ve pıhtılaşma bozukluklarına neden olabileceği ileri sürülmektedir (5, 41, 55).

KKKA' da kemik iliği tablosu değişkendir. Kemik iliği incelemelerinde hematopoetik öncül hücrelerinin fagositozu (hemofagositoz) ve kemik iliği hipoplazisi gözlenmiştir (56-58). Ülkemizdeki bir olgu serisinde KKKA'lı olguların %50'sinde hemofagositoz gözlendiği ve hastalardaki sitopeniyi açıklayabileceği ileri sürülmüştür (55). Bunun dışında KKKA hastalarında ferritin seviyesinin son derece artmış olduğu rapor edilmiştir ve bu bulgunun birincil hemafagositik lenfositosisin tanılayıcı kriterleri arasında olduğu kabul edilmiştir (41).

Endotel hasarı da trombositopeninin bir nedeni olabilir (54). Plazma koagülasyon faktörlerinin düşüklüğü ya artmış tüketim ya da bozulmuş sentezin sonucudur. Artmış tüketim DIC'de meydana gelir. DIC, KKKA'nın erken ve belirgin özelliğidir (48).

Kanda kompleman sisteminin aktivasyonu ile birlikte immünkompleks oluşumu ile ilgili bulgular vardır ve bu şekilde kapiller yatak hasar görüp renal ve pulmoner yetmezlik gelişebilir (54, 58).

İmmünkomplekslerin komplemanın C3a ve C5a fragmanlarını aktive ederek vasküler hasar oluşturduğu bilinmektedir. Bu fragmanlar aynı zamanda mast hücreleri, bazofiller ve trombositlerden vazoaaktif aminlerin salınmasını sağlarlar. C5a aynı zamanda monositlerden IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF salgılanmasını sağlar. Salgılanan IL-1 ve TNF ile endotel hücrelerinden fibrinolizin baskılanması için plazminojen aktivatör-inhibitör (PAI) ve dıştan gelen (ekstrinsik) pıhtılaşma yolağının başlaması için de doku faktörü serbestleşir. Sonuçta vasküler hasar ve permeabilite artışı ile damar içi pıhtılaşma şiddeti artar. Endotel hasarı döküntüye neden olabilir ve trombosit birikimi ve degranülasyonu ile intrinsik koagülasyon mekanizmalarını aktive edebilir (58).

Plazma koagülasyon faktör sentezinin bozulması ise karaciğer fonksiyon bozukluğunun sonucudur. Karaciğer çoğu koagülasyon faktörünün sentez yeridir. KKKA'da karaciğer fonksiyon bozukluğu özellikle hastalığın geç döneminde hemostazın bozulmasına katkıda bulunmaktadır (52). Hastalıkta meydana gelen karaciğer hasarının doğrudan viral sitopatik etkiye bağlı olduğu bildirilmektedir (25).

Hastalıktan ölenlerde serebral kanama, şiddetli anemi, dehidratasyon ve şok, miyokard infarktüsü, akciğer ödemi ve plevral effüzyon görülmektedir (15).

KKKA nedeniyle ölen ve böbrek yetmezliği gelişen başka bir hastada böbreklerin postmortem histopatolojik incelenmesinde sadece glomerüllerde orta dereceli mezangial genişleme görüldüğü ve böbrek yetmezliğinin sitokinlerin aracılık ettiği intrarenal hemodinamik disregülasyona bağlı olduğu bildirilmektedir (52).

### **2.1.8. Hastalığın teşhisi**

Hastalığın özgül tanısında kullanılan yöntemler: virüs izolasyonu, serolojik tanı yöntemleri ve moleküler tanı yöntemleridir (3).

Virüs izolasyonu genellikle, akut dönemdeki hastaların kan örneklerinin ya da kene homojenat sıvılarının yeni doğmuş fareye intrakraniyal (kafa içi) veya intraperitoneal (periton içi) inokülasyonu ile yapılmaktadır (20, 33, 39, 59).

Serolojik testler, kanda oluşan immunoglobulin M (IgM) ve immunoglobulin G (IgG) yapısındaki antikorların her ikisini de göstermeye yönelik, indirekt fluoresans

antikor (IFA) ve enzyme-linked immunoassay (ELISA) testleri tanı amacıyla günümüzde kullanılmaktadır (20, 60, 61,62).

Enfeksiyonun moleküler tanısında, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve real-time RT-PCR yöntemleri kullanılmaktadır (2, 15).

### 2. 1. 8. 1. Ağır olgu tanımı

Swanepoel ve arkadaşları (58), hastalığın klinik bulguların başlamasından sonraki ilk beş gününde çizelge 2.3’de verilen laboratuvar değerlerinden en az biri varsa **ağır olgu**, hiçbiri yoksa **hafif olgu** olarak tanımlamış ve bu bulgulardan en az birinin varlığında hastaların %90’ının ölümlerle sonuçlandığını belirtmişlerdir. Lokositozis, Swanepoel tarafından tanımlanan kriterlerden biri olmasına rağmen, son raporlarda, ölen olgular arasında sıklıkla gözlenmemiştir. Diğer olgu serilerinde AST, ALT ve LDH düzeyleri ağır vakalarda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (63).

Çizelge 2.3 Swanepoel ve arkadaşlarının ağır olgu tanımlamada kullandığı laboratuvar bulguları (58)

Değişkenler	Laboratuvar Bulguları	Referans Değeri
Kan lökosit sayısı ( $\times 10^9/L$ )	$\geq 10.000/mm^3$	4.0-11.0
Kan trombosit sayısı ( $\times 10^9/L$ )	$\leq 20.000/mm^3$	150-450
AST değeri (IU/L)	$\geq 200$ IU/L	9-36
ALT değeri (IU/L)	$\geq 150$ IU/L	10-28
aPTT (s)	$\geq 60$ s	25.1-34.7
Fibrinojen seviyesi ( $\mu g/dl$ )	$\leq 110$ $\mu g/dl$	200-450

Ülkemizden bir çalışmada ağır olgularda AST ( $>700$  IU/L) ve ALT ( $>900$  IU/L) seviyeleri daha yüksek bulunmuştur (64).

Çok değişkenli bir analizde, ALT seviyesindeki artışın ölümün meydana gelmesi ile ilişkili olabildiği bulunmuştur (OR:1.003, CI:1.001-1.005, p:0.007). Hastalığın ilerlemesi (ağır olgu) olarak ALT’deki artış, karaciğer yetmezliğinin göstergesi olabilir. Ergönül tarafından tanımlanan bu kriterlere uygun olarak, aşağıdaki laboratuvar bulgularından birine sahip hasta ağır olgu olarak tanımlanmaktadır: Kan trombosit

sayısı  $\leq 20.000/\text{mm}^3$ , AST değeri  $\geq 700$  IU/L, ALT değeri  $\geq 900$  IU/L, aPTT  $\geq 60$  s, Fibrinojen seviyesi  $\leq 110$   $\mu\text{g}/\text{dl}$  (64).

Bu laboratuvar bulgularının yanı sıra, melena, hematemez ve uyku hali de Şiddetli olgu parametreleri olarak tanımlanmaktadır (64). Bu çalışmaların dışında evik ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da, viral yük, melena, uyku hali, uzamış aPTT ( $\geq 60$  s), ve trombosit sayısının azalmasını ( $\leq 20 \times 10^9/l$ ) ağır olguyu tanımlayan en önemli risk faktörleri olarak değerlendirmişlerdir (45).

Bu bulgulara ek olarak, Bakır ve arkadaşları da splenomegali ve şuur değişikliğinin kötü prognostik faktörler olduğunu belirtmişlerdir (65).

Son dönemlerde, thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) aktivitesinin azalması (66), NK hücrelerinin (67) ve sitotoksik T lenfosit (CD8) sayılarının artması (68), serum ferritin (69) ve neopterin (70) seviyelerinin yükselmesi, znebilir urokinaz tip plazminojen aktivatör reseptör (suPAR) değerinin yüksek olması (71), hyaluronik asit, znebilir hücreiçi adezyon molekülü-1 (sICAM-1), znebilir damarsal hücre adezyon molekülü-1 (sVCAM-1) ve damarsal endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) seviyelerinin yükselmesi (72) kötü prognoz ve ölümcül sonucun tespit edilmesinde kullanılabilecek parametreler olarak değerlendirilmektedir.

### **2.1.9. Tedavi**

Watt ve arkadaşlarının 1989 yılında yaptıkları bir çalışma ile KKKAV replikasyonunun ribavirin tarafından engellendiğinin bulunması ile KKKKA hastalarında tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır (18). Bununla birlikte, ribavirinin etkinliği henüz kanıtlanamamıştır. Ribavirin tedavisinin, ölüm oranlarında önemli bir değişiklik yapmaması ve viral yük titresini değiştirmemesi gibi ribavirinin bu hastalık için tam etkili bir antiviral ilaç olmadığını göstermektedir (73, 74).

### **2.1.10. Korunma ve kontrol**

Yüksek patojenik özelliği nedeniyle KKKKA virusu Amerika Birleşik Devletleri'nde National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) tarafından potansiyel biyoterörizm ve/veya biyolojik savaş ajanları listesine alınmıştır. Bunyavirus ailesine mensup Rift Vadisi ateşi virüsü ve Hanta virüsler bu kuruluşun listesinde A kategorisinde, KKKKA virusu ise C kategorisindedir (75). Virüs oldukça hassattır ve

konak dışında hayatta kalma şansı düşüktür. 56°C'de 30 dakika kuru ısı, yaygın dezenfektanlar, çözücüler ve ultraviyole ışığında virüs hızla ölmektedir (76). KKKA hastalığından korunmak ve kontrol etmek için Dünya Sağlık Örgütü ve Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi çeşitli önerilerde bulunmaktadır (15, 77).

## **2.2. Sitokinler**

### **2.2.1. Sitokinlerin tanımı ve işlevleri**

Sitokinler, hücreler arası sinyalleri ileten, hücre sel yanıtı neden olan ve mikroorganizmalara karşı başlangıç cevabı süresince çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen, immün sistemin düzenleyicisi hormon benzeri peptitler ve glikoprotein yapısında araçlardır (78).

Sitokinler geçmişi çok eskiye dayanan moleküllerdir fakat detaylı çalışmalar 1950'li yıllarda hız kazanmış ve 1957 yılında ilk sitokin olan interferon keşfedilmiştir.

Sitokin kelimesi de ilk kez 1974 yılında kullanılmıştır (79, 80).

Sitokinler: interlökinler, lenfokinler, monokinler, büyüme faktörleri, interferonlar ve kemokinlerden oluşan geniş bir ailedir (78). Bu aile üyeleri, çok geniş bir yelpazedeki hücre tipleri tarafından üretilirler. Sitokinler her ne kadar üretildikleri yere göre isimlendirilselerde günümüzde genel olarak sitokin adıyla anılmaktadırlar (81-83).

Birçok sitokinin birden fazla biyolojik özelliği vardır ve bazı fonksiyonları da paylaşırlar. Sitokinler, hedef hücrelere özgü sitokin reseptörlerine bağlanarak hücrede sinyal iletişimini ve ikincil mesaj taşıyıcı yolları başlatırlar. Bunun sonucunda, o hücrede mitotik bölünmeye yol açan gen aktivasyonuna, büyüme ve farklılaşmaya, göç ve apoptoza neden olurlar. Sitokinler, doku homeostazında olduğu gibi enflamatuvar işlemlerde de önemli rol oynamaktadırlar. Ateş ve akut faz cevabını oluşturur. Antiviral etkinlik gösterirler. Bunun dışında, konnektif doku, cilt, sinir sistemi ve diğer organların somatik hücreleri arasında da iletişim sağlarlar (81, 84).

Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin sentez ve etkilerini değiştirebilirler, genellikle uyarıldıklarında sentezlenirler, depo edilmezler, sentez ve salgılanmaları geçici ve kısa sürelidir (81-83).

Sitokinler, bazı fizyolojik fonksiyonları dışında, immün yanıtın başlamasını sağlarlar ve immün cevabı şiddetlendirmek veya baskılamak suretiyle regüle ederler. Bu



çerçeve içinde patojenlere karşı dirençte aracılık edecek immün yanıtın tipini ve efektör mekanizmalarını da tayin ederler. Ancak aşırı sentezlendikleri takdirde, bunların patolojik olayları da uyarabildikleri bilinmektedir (84).

İki sitokin birbirlerinin etkilerini ortadan kaldırabilir, arttırabilir hatta değişik bir etki oluşumuna yol açabilirler. Birbirleri ile etkileşimleri çok hassas bir dengede gerçekleşmektedir (82).

Sitokinler, hedef hücrelerin ve olayın gelişim evrelerine göre değişebilen etkiler gösterirler yani pleotropik ve çoğul aktivite gösterirler (84).

Sitokinler aynı hücre tipinde farklı etkileri indükledikleri gibi, çeşitli hücre tiplerine göre de farklı etkiler gösterebilmektedirler (84).

Sitokinler otokrin, parakrin ve endokrin etki gösterirler. Sitokinlerin çoğu *in vivo* parakrin etki gösterirler. Bazı sitokinler ekstrasellüler matris elemanlarına da bağlanabilirler (82). Lokal yanıtlar sırasında sitokin yoğunluğu periferik kanda çok kez anlamlı düzeylere ulaşmaz. Sistemik yanıt ise, sitokin setlerindeki yoğunluğun, sistemik enflamasyon sonucu kanda yüksek düzeylere ulaşması halidir. Bu durumun septik şok, serebral malarya ve toksik şok gibi konak için hasar oluşturucu patolojilere yol açabileceği bilinmektedir (84).

### 2.2.2. Sitokinlerin sınıflandırılmaları

Sitokinlerin sınıflandırılmaları genellikle karışıklık yaratmaktadır. Çünkü bir sitokinin aynı hücrede bile değişik etkilere yol açabildiği göz önüne alınırsa sitokinleri standart bir sınıflandırma içine almak zordur. Başlıca fonksiyonlarına göre 4 büyük grupta toplanılabilirse de pek çok sitokinin birden fazla grupta yer alabileceği unutulmamaktadır (çizelge 2. 4 ) (85).

Çizelge 2.4 Sitokinlerin başlıca fonksiyonlarına göre gruplandırılması (82)

Fonksiyon	Sitokin
Doğal immünite medyatörleri	TNF, IL-1, IL-6, Tip-I IFN'lar ve kemokinler
Lenfosit aktivasyon, çoğalma, farklılaşmasını düzenleyenler	IL-2, IL-4, TGF- $\beta$
İmmün aracılı enflamasyonu düzenleyenler	IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$
Hematopoezi uyaranlar	IL-3, IL-7, IL-9, IL-11

Doğal bağışıklığı dzenleyen sitokinler, viral enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan sitokinler ile bakterilere karşı korumayı sağlamak için enflamatuar reaksiyonları başlatan sitokinlerdir (86).

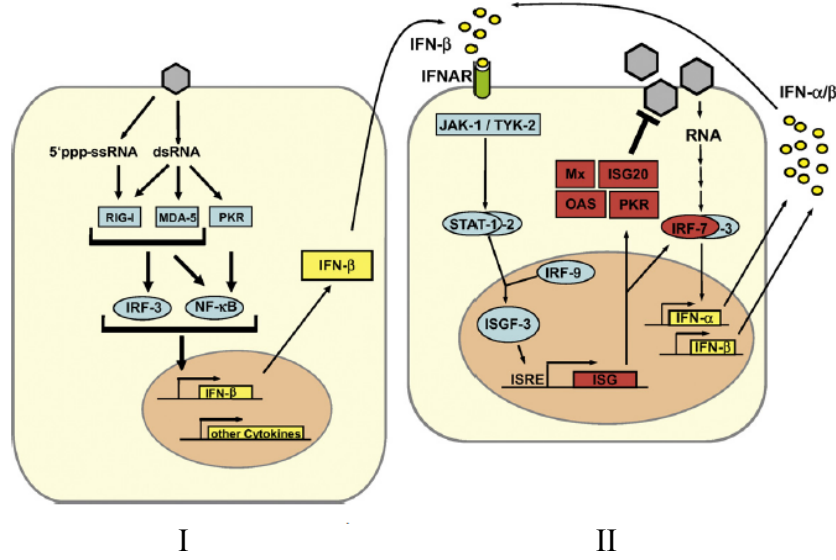
### 2.2.3. İnterferonlar

İnterferonlar (IFN), yaklaşık 500 milyon yıl önce ilk kordalılarda var olduğu bilinen ve ilk olarak Isaacs ve Lindenmann tarafından 1957 yılında antiviral bir ajan olarak keşfedilmiş, protein ve glikoprotein yapısındaki maddelerdir (87, 88). İnterferonlar doğal ve kazanılmış antiviral mekanizmaların hem uyarılması ve dzenlenmesinde hem de viral enfeksiyonlar süresince sayısız bağışıklık etkileşimde rol oynamaktadırlar (89). İnterferonlar, çeşitli hücre tipleri tarafından yapılan, antiviral, antiproliferatif (antitümör) ve immunomodulatör özellikleri de kapsayan pliotropik biyolojik işlevleri olan bir protein ailesidir (90). Bu aile 2 grup içerisinde sınıflandırılmıştır. Viral interferonlar olarak bilinen tip I interferonlar birçok INF- $\alpha$  izoformundan, tek bir IFN- $\beta$  ve IFN- $\epsilon$ 'den oluşmaktadır. Tip II interferon ise immun interferon olarak bilinmektedir ve sadece IFN- $\gamma$ 'yı içermektedir. Tip II interferon (IFN- $\gamma$ ) sadece CD4 Th1, CD8 sitotoksik hücreler ve NK hücreleri tarafından yapılmasına karşın, tip I interferonlar tüm çekirdekli hücreler tarafından yapılmaktadır. Tip III interferonlar (IFN-  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ ) son dzenlerde tanımlanmışlardır (tablo 2. 5) (88, 91, 92).

İnterferon grup üyelerinin her biri farklı reseptörlere sahiptirler fakat hücre içinde, aşağı bölgelerde de (downstream) yer alan sinyal moleküllerini ortak kullanarak aynı genlerin ekspresyonunu dzenlerler. Zarf glikoproteinleri, genomik DNA, CpG DNA, 5'-trifosfat uçları olan RNA'lar, çift zincirli RNA (dsRNA) veya tek zincirli RNA (ssRNA) gibi viral faktörler hücrel pattern-recognition reseptörleri (PRR), toll-like reseptörleri (TLR), retinoik acid-inducible gene I (RIG-I)-like reseptörler (RLR) ve nukleotid oligomerizasyon domain (NOD)-like reseptörler (NLR) ile etkileşime girdiğinde hücre içi birçok proteinin ekspresyonunu artırır. Ayrıca virüsle infekte hücrelerin apoptozu ve viral enfeksiyonlara karşı hücrel direncin oluşmasını uyarırlar (89, 91, 92).

IFN- $\alpha/\beta$  300'den fazla IFN tarafından uyarılan genlerin ekspresyonunu şekil 2.2'de gösterildiği gibi aktive ederler. İnterferonların uyardığı proteinler arasında;

enzimler, transkripsiyon faktörleri, hücre yüzey glikoproteinleri, sitokinler, kemokinler ve fonksiyonları bilinmeyen büyük bir grup protein yer almaktadır (5).



Şekil 2.2 Tip I IFN uyarımı, sinyal oluşumu ve işlevi (Weber F. 2008) (4).

I-5'trifosfat ssRNA ve dsRNA'lar iki önemli virüs replikasyon ürünüdürler. Bu ürünler, hücre içi reseptörlerinden RIG-I, MDA-5 ve PKR'ye bağlanır ve onları aktif hale geçirirler. Bu moleküllerin çeşitli adaptör ve kinaz proteinleri içeren bir sinyal iletim zincirini uyarması sonucunda IRF3 ve NFκB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gerçekleşir. Bu transkripsiyon faktörleri elbirliğiyle IFN-β ve diğer sitokinlerin promotörüne bağlanarak gen (genlerin) ekspresyonunu başlatırlar. II- IFN-β tip I IFN reseptörüne (IFNAR) bağlanarak JAK/STAT yolağı aracılığıyla sayısız ISG'nin ekspresyonunu sağlamaktadır. IRF-7 çeşitli IFN alttipinin ekspresyonunu uyararak IFN yanıtı artırır. Mx, ISG20, OAS ve PKR antiviral aktivitesi olan proteinlerdir.

RIG-I (retinoik acid inducible gene I), MDA-5 (melanoma differentiatio-associated gene 5), PKR (protein kinase R), IRF (interferon regulatory factor), NFκB (nuclear factor kappa B ), JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), MxA (myxovirus resistance protein 1), ISG20 (IFN-stimulated gene 20), OAS (oligoadenylate synthetases)

Çizelge 2.5 Interferon aile üyeleri (88, 91, 92)

Tipler	IFN		Gen lokusları	Aminoasit sayıları	Moleküler Ağırlık(kDa)	Ekspresyon modeli
	alttipleri	Reseptörler				
I	IFN- $\alpha$	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	165-166 <sup>b</sup>	15-23	Her yerde ekspresse olur
	IFN- $\beta$	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	166 <sup>b</sup>	15-23	Her yerde ekspresse olur
	IFN- $\delta^c$	IFNAR-1/IFNAR2	-	170	20	Trofoblast
	IFN- $\epsilon$	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	208	24.4	Uterus, over
	IFN- $\omega$	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	172 <sup>b</sup>	20-23	Lokositler
	IFN- $\kappa$	IFNAR-1/IFNAR2	9p21	180 <sup>b</sup>	24.5	Epidermal keratinositlerde seçici olarak ekspresse olmaktadır.
	IFN- $\tau^d$	IFNAR-1/IFNAR2	-	191 <sup>b</sup>	20-22	Trofoblastlar
	IFN- $\zeta^e$	IFNAR-1/IFNAR2	-	161 <sup>b</sup>	20	Dalak, timus, lenf nodülü
II	IFN- $\gamma^f$	IFNGR-1/IFNGR2	12q24.1	146 <sup>b</sup>	34	Aktive olmuş T lenfositleri, makrofaj ve NK hücreleri
III	IFN- $\lambda_1$ (IL-29)	IL-28R $\alpha$ /IL-10R2	19q1	200	20-33 <sup>g</sup>	Her yerde ekspresse olur
	IFN- $\lambda_2$ (IL-28A)	IL-28R $\alpha$ /IL-10R2	19q1	200	22	Her yerde ekspresse olur
	IFN- $\lambda_3$ (IL-28B)	IL-28R $\alpha$ /IL-10R2	19q1	196	22	Her yerde ekspresse olur

a: İnsan

b: Sinyal peptidleri içermez

c: Sadece domuz ve büyükbaş hayvanlarda bulunur

d:Sadece kemirgenlerde bulunur

e: Sadece farelerde bulunur

f: Bir homodimer olarak hareket eder

g: Glikozilizasyon işleminden dolayı

#### 2.2.4. İnterferonların KKKK patogenezisinde rolü ve KKKAV'nin

##### interferonlardan kaçma mekanizmaları

Doğal bağışık yanıt, interferon salınımını kontrol eden genlerin düzenlenmesini sağlar ve tip I interferon (IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$ ) salınmasını arttırarak virüslere karşı konakta ilk savunmayı oluşturur (93).

KKKAV ile infekte hücreler inokülasyondan 48 saat sonra IFN salgılamaya başlamaktadır (94). Tip I interferonlar tarafından güçlü bir şekilde baskılanmasına rağmen KKKAV insanda yaptığı yıkıma hala devam etmektedir. Bu virüsün mortalite oranının %70'e yükselmesinin nedeninin; ya virüsün uyardığı interferonların tedavi edici olmadığı fakat koruyucu bir etkisi olduğu ya da, infekte hücreler tarafından interferon yapımının yetersiz olduğudur. Elde edilen son bilgiler, her iki mekanizmanın da yer aldığını göstermektedir. Weber ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada daha önceden oluşturulmuş bir KKKK enfeksiyonuna karşı interferonun anlamlı aktivitesinin olmadığı gösterilmiştir (4). Enfeksiyondan 1 saat sonra 1000U/ml interferon ile hücrelerin tedavisi etkili olmamışken, enfeksiyondan önce aynı doz interferon uygulaması KKKAV replikasyonunu anlamlı olarak inhibe etmiştir. Bu sonuç KKKAV'nin interferon sinyal oluşumunu güçlü bir şekilde etkisiz hale getirdiğini göstermektedir. Bu virüsün interferon sentezinin uyarılmasını çeşitli bağımsız stratejilerle engellediği görülmektedir. Bunlardan biri; Bunyavirüslere ve diğer negatif zincirli RNA virüslerine benzer olarak KKKAV, interferon uyarıcı ddRNA'nın önemli miktarlarda üretimini yapamaz. İkinci strateji ise; bir 5' trifosfat ucu taşıyan viral ssRNA tarafından tetiklenen önemli RIG-I sinyal oluşum yolağı KKKAV genomu aracılığıyla aktif olmamaktadır. *Rift Valley fever virüsü (RVFV)* ile akraba ssRNA genomunun bir 5' trifosfat grubu vardır ve RIG-I aracılığıyla interferon uyarımını başlatır. Oysaki KKKAV genomunun bir RIG-I-nötral 5'monofosfat grubu vardır. Büyük olasılıkla, genom replikasyonu süresince KKKAV, RIG-I aracılı tanınmaktan kaçmak için 5' trifosfat grubunu parçalar. Bu virüsün infekte ettiği hücrelerin interferon uyarımı zayıftır ve nispeten geç meydana gelmektedir. Bundan dolayı *Bunyaviridae* ailesinin üyelerinin RIG-I yolağını baskılamak için iki köklü farklı stratejiye sahip oldukları görülmektedir (4).

- *RVFV*, interferon uyarımını bu iş için tahsis ettiği anti-interferon faktör, yapısal olmayan proteyin (NSs) sentezleyerek baskılar.

- KKKAV kendi genomundan RIG-I ligandını uzaklaştırır (5).

Andersson ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada da; replike olan KKKAV'nin (muhtemelen IRF-3 yolağının aktifleşmesine müdahale ederek) daha sonra interferon yanıtını geciktirdiği bildirilmiştir. Elde edilen tüm bilgiler, virülans bir faktörün varlığını ve bu faktörün memeli konak içerisinde hızlı viral yayılmasına izin vermek için konak savunmasını zayıflattığını ileri sürmektedir (6). Yine bu çalışmada, virüsün yıkıcı seyrine devam etmesinin interferonun, sonuç olarak hücre içi taşımacılık işlemlerinin bir çeşidi ile ilişkili, büyük GTPazların dinamin süperailisine ait MxA'nın (IFN- $\alpha$  ve  $\beta$  tarafından uyarılmaktadır ve virüs RNA'sı hücreye girdikten kısa bir süre içinde bulaşıcı virüsün replikasyonunu engeller) yetersiz miktarda ve/veya çok geç uyarılmasının etken olabileceği ileri sürülmektedir (95).

### 2.2.5. İnterferon gen ailesi

9 nolu kromozomun kısa kolunda (farelerde 4 nolu kromozomda), 400 kb'lık bir bölgeyi içeren, 26 IFN geninden oluşan tip I interferon gen kümesinin fiziksel bir haritası yapılmıştır. Bu genlerin bir kısmı psödogendir (90). IFN gen kümesi içerisinde 15 IFN geni; 1 IFN- $\epsilon$  geni, çoğunlukla telomerik bölgede yerleşim gösteren sadece bir IFN- $\beta$  geni bulunurken en az 13 farklı gerçek IFN- $\alpha$  geni, (bazı psödogenlerle birlikte) bu kromozomal bölgeye dağılmışlardır. IFN- $\alpha/\beta$  genleri intron içermezler. Buna karşın insanlarda 12 nolu kromozomun (farelerde 10 nolu kromozom) uzun kolunda yerleşim gösteren IFN- $\gamma$  üç intron içermektedir (90, 96).

IFN- $\alpha$  genleri 2 gruba ayrılmıştır:

- IFN- $\alpha$  4: Protein sentezinin devam etmesine ihtiyaç duymaksızın ve hızla uyarılan, acil-erken yanıt geni,
- Aralarında IFN- $\alpha$  2, IFN- $\alpha$  5, IFN- $\alpha$  6 ve IFN- $\alpha$  8'in de yer aldığı, geçikmiş uyarıda görev alan, daha yavaş sentezlenen bir grup IFN- $\alpha$  geni (88).

### 2.2.6. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$ , TNF süperailisine ait pleiotropik, inflamatuvar bir sitokindir. İmmun yanıtın gelişiminde önemli bir rol oynaması ile birlikte bu sitokinin ortaya çıkan fizyolojik rolleri hakkında çeşitli tartışmalara yol açan bilgiler vardır. Örneğin; hücre tipine göre farklı fonksiyonlara sahip olduğu (pleiotropik) ve bu dokularda farklı plazma seviyelerinde

bulunduğu gibi. İlk olarak, Carswell tarafından 1975 yılında farelere nakledilen tümörlerin nekrozuna neden olan bir serum faktörü olarak keşfedilmiştir (97, 98).

TNF- $\alpha$  geni 6 nolu kromozomda büyük doku uygunluk kompleksi sınıf III içerisinde yerleşim göstermektedir. Yaklaşık olarak 3,6 kb uzunluğunda olan bu gen 4 ekzon içermektedir. Bu genin ürünü 26 kDa öncül bir protein olarak sentezlenir, enzimatik işlemlerden sonra 17 kDa'luk çözünebilir bir protein olarak salınır. 157 aminoasitten oluşan bu protein glikozillenmemektedir. Bu proteinin başlıca reseptörleri TNFR1 ve TNFR2'dir (197, 99, 100).

Çoğunlukla monosit/makrofajlar tarafından salınmaktadır ve birçok biyolojik işleve sahiptir; hücre çoğalması ve farklılaşmasını, apoptozu, lipid metabolizmasını, pıhtılaşmayı, insülin direncini ve endotel fonksiyonunu etkiler (98).

TNF- $\alpha$  ve IL-1, IL-6 ile birlikte "endojen pirojen" olarak görev yaparlar. TNF- $\alpha$ 'nın en büyük fonksiyonu, tümör hücreleri üzerine gösterdiği sitolitik aktivitedir (101). Ayrıca IL-1 ile birlikte endotelyumdaki birçok değişimden sorumludur. Antikoagulan mekanizmaları inhibe ederek, trombotik işlemleri inhibe ederler ve bundan dolayı venöz tromboz, arterioskleroz, vaskülit gibi patolojik işlemlerde önemli rol oynarlar. TNF- $\alpha$ , fagositozu ve makrofajlarda IL-1, prostoglandin E2 ve süperoksit dismutaz sentezini uyarır (102).

TNF- $\alpha$ 'nın bu fonksiyonlarının yanı sıra, bakteriyel ve belirli mantar, viral ve parazitik istilacılara karşı oluşturulan immün yanıtta önemli rolleri vardır. Lokal immün yanıtta anahtar bir aracı olarak işlev görür. Akut faz proteini olarak görev yapan bu molekül, sitokin fırtınasını başlatır ve damarsal geçirgenliğin artışına neden olur, böylece enfeksiyon alanına makrofaj ve nötrofillerin toplanmasını sağlar (103).

T helper 1 (Th 1) hücrelerinden salınan, tip 1 sitokinler arasında yer alan ve proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$ , enfeksiyöz ve immuno-inflamatuvar hastalıkların geniş bir bölümünde immün yanıtın temel aracı molekülüdür. Bu sitokin bu hastalıklara karşı konak savunmasında faydalı bir fonksiyonu olmasına karşın bu molekülün kontrol edilmeyen aşırı yapımı aynı zamanda hastalığın patogenezinde katkıda bulunabilmektedir. Örneğin; ilk dönemlerde bakterinin kendisinin konağı istilasından sonra dolaylı olarak sepsise neden olduğuna inanılıyordu. Sonrasında ise immün yanıt sırasında TNF- $\alpha$  gibi konağın kendisine ait proteinlerin sepsisi uyardığı tanımlanmıştır. Bölgesel enfeksiyonu aşacak ölçüde sitokin yapımının artması veya enfeksiyonun

kemik iliğini tutması sonucunda sepsis meydana gelir. TNF- $\alpha$ , kanser gelişimi ve yayılmasına da yardımcı olabilir Ayrıca yüksek seviyede TNF- $\alpha$ 'nın mortalite riskini artırdığıda saptanmıştır (104).

Bakteri, virüs ve parazit kaynaklı endojen ve ekzojen faktörler TNF- $\alpha$  ve diğer sitokinlerin yapımını uyarmaktadır. Bakteri hücre duvarını oluşturan lipopolisakkaritler özellikle TNF- $\alpha$  sentezinin potansiyel uyarıcılarıdır (103).

### 2. 2. 8. KKKK patogeneğinde TNF- $\alpha$ 'nın yeri

Sitokinler, bazı damar genişletici materyallerin yapımını, trombositlerin bir araya toplanmasını ve pıhtılaşma proteinlerinin aktivasyonunu uyarmaktadırlar. Çeşitli çalışmalarda sitokinlerin kapiller permeabilite artışı ve pıhtılaşma fonksiyon bozukluklarının kanamalara, DIC ve çoklu organ yetmezliğinin gelişmesine katkıda bulunabildiği gösterilmiştir (5, 51, 55).

Ölümcül vakalarda, inflamatuvar mediatörler muhtemelen önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca bu hastalarda şok ile birlikte fulminan seyir gözlenmektedir (48).

*Ebola*, *Dengeu virüs*'lerine benzer diğer kanamalı ateş virüsleri için, hastalığın şiddeti, damar sızıntısı ve proinflamatuvar yanıtın gücü arasında bir bağlantı olduğu bildirilmektedir. Hastalığın gelişmesinde anahtar oyuncular, IL-10, IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$ 'dır. Ölen yellow fever kanamalı ateş hastalarında IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  seviyelerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Diğer bir çalışmada, *Ebola virüs*'ü ile infekte olan ve yaşayan hastalar ile erken dönem yüksek IL-6 ve IL-1 $\beta$  seviyeleri arasında bir bağlantı olduğu bulunmuştur. Buna karşın, IL-10 salınımı, plazmada yüksek IL-1RA (interlökin reseptör antagonisti) ve neopterin seviyesi ile ölen hastalar arasında herhangi bir bağlantı bulunamamıştır. Neopterin türevleri, IFN'ler tarafından uyarılan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından yapılmaktadırlar. Neopterin, hücre aracılı bağışık yanıtın etkinliğini değerlendirmek için kullanışlı bir araçtır (5).

Başka bir çalışmada da, KKKK hastalarında yüksek serum neoprotein düzeyi ile ölüm oranı arasında bir bağlantı olduğu bildirilmektedir. Neoprotein, fazla salınan IFN- $\gamma$ 'nın makrofajları aktive etmesiyle üretildiğinden dolayı, bu bulgular KKKK'nın patogeneğinde makrofaj aktivasyonunun ve sitokin salınımının önemli rolü olduğunu ileri süren kanıtları desteklemektedir (51).



KKKA hastalığının şiddeti ve sonucu üzerine etki eden faktörleri aydınlatmak için yapılan bir başka çalışmada; orta şiddetli seyir gösteren hastalarda IL-10, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonları düşük, ölen hastalarda yüksek tespit edildiğinden IL-10, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  yüksek konsantrasyon seviyeleri ile hastalığın seyrinin kötü olması arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'nın artmış yapımı, sitokinlerin aracılık ettiği endotel hasarını, DIC, organ yetmezliğini ve şoku tetiklemektedir (8).

Ayrıca Papa (105), Ergönül (9) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, KKKA hastalarında TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 seviyelerinin artmış olduğu saptanmıştır. Bu araştırmacılar aynı zamanda, KKKA patogenezinde sitokin fırtınasının esas rolünü vurgulayarak, ölen hastalarda hastalığın orta şiddette seyir gösterdiği hastalara oranla TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Papa ve arkadaşları KKKA hastalık şiddeti ile yüksek TNF- $\alpha$  seviyesi arasında bir bağlantının olduğunu onaylamaktadırlar. Fakat yüksek IL-6 seviyesinin orta ve ağır vakaların her ikisinde de bulunabildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, yaşayan hastalarla karşılaştırıldığında sadece ölen hastalarda hem TNF- $\alpha$  hemde IL-6 seviyeleri yüksektir (5, 9, 105).

Yüksek seviyede IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gibi Th1 sitokinlerinin aşırı monosit aktivasyonunu uyardığı ve bu aktivasyonunun hemafagositik lenfositosisinin olası immunopatolojik mekanizması olabileceği rapor edilmiştir (58).

Ayrıca 2008 yılında yapılan bir çalışmada, Türkiye'deki epidemiler süresince, KKKA'nin en önemli ve ölümcül özelliğinin sitokin fırtınasına ek olarak virüs ilişkili hemofagositozik sendrom olduğu görülmüştür. KKKA'de bu uyarıcı, özellikle TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve muhtemelen diğer inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-12, and IL-18) aşırı salınımına neden olan virüs ilişkili CD4+TH1 efektör hücre uyarımıdır. Bu ters immünolojik yanıtın sonunda, çok fazla makrofajın birlikte aktive olma (co-activations) durumu ortaya çıkar ve kan hücrelerinin aşırı patolojik fagositozu ağır sitopenilere, karaciğer fonksiyon bozukluklarına ve büyük kanamalara neden olur (106).

### **2.3. Polimorfizm ve tanımı**

Poli ve morfizmos kelimelerinden oluşan polimorfizm, eski Yunanca'da "**çok şekillilik**" anlamı taşıyan bir sözcüktür. Genetik polimorfizm, bir populasyonda, farklı allellere

bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir (111). Polimorfizmler bir veya daha fazla bazın diziyeye katılması (insersiyon), diziden baz eksilmesi (delesyon) veya bir bazın diğeri ile yer değıştirmesi (substitüsyon) gibi birçok yolla oluşabilir. Polimorfizmin farklı habitatlarda adaptasyon avantajı sağlayan alellere yönelik baskıdan kaynaklandığı düşünölmektedir (112). Populasyon genetikçilerine göre, bir gen lokusu, nadir aleller en az %1 frekansına sahip oldukları ve sonuçta bu aleller için heterozigotlar en az %2 oranında göröldükleri takdirde polimorfik olarak tanımlanırlar. Populasyon genetiğı açısından belli bir frekansa gereksinim olmasına karşın, moleküler biyoloji açısından, frekansın önemi olmayıp, bir ailede dahi görölen varyant, polimorfik adını almaktadır.

Polimorfizm; tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm), DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görölebilir.

### **2.3.1. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP: single nucleotide polymorphism)**

İnsan genomunda en çok görölen polimorfizmler tek bir nükleotidin değışmesi ile meydana gelen tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP). İlk olarak 1980'lerde enzim kesim bölgelerinin varlığı veya yokluğunu tanımlamak amacıyla restriksiyon enzimleri kullanılarak tanımlanmıştır (112). SNP'ler, genomda yaklaşık her 1000 bazda bir tane olacak sıklıkla bulunur (113). Ancak SNP tanımı, tek bir nükleotidin insersiyon ya da delesyonunu da içerir (Basit Indel Delesyonları). Bazı SNP'ler ise restriksiyon bölgelerinde değışimlere yol açar (Restriksiyon Bölge Polimorfizmleri, RSP: Restriction Site Polymorphism). İnsan genomunun yaklaşık %1,5'i, kodlayan DNA dizilerini içerir ve SNP'lerin çoğı intron ve genler arası (intergenik) diziler gibi kodlama yapmayan DNA bölgelerinde meydana gelir (114).

### **2.3.2. Genetik polimorfizmin saptanmasında kullanılan yöntemler**

Genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde; PCR (Polymerase Chain Reaction: polimeraz zincir reaksiyonu), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi), VNRT (variable number of tandem repeats: değışken ardışık tekrarlar), SSCP (single stranded conformational

polimorphism: tek iplikçik yapısal çeşitlilik) laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır (112).

### **2.3.2.1. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)**

Restriksiyon enzimleri (RE), bakterial virüslerin meydana getirdiği enfeksiyonlara karşı savunma ajanları gibi işlev gören prokaryotik proteinlerdir. Bu enzimin keşfine yol açan ilk gözlemler, bazı bakteri soylarının “konakçı kontrolündeki sınırlama” (*host-controlled restriction*) olarak anılan, bakteriofaj enfeksiyonlarına bağışıklığın gösterildiği 1950’lerin başlarında yapılmıştır. Bu enzim bakterilerde doğal olarak bulunur ve bakteriyi yabancı DNA’lara karşı korumaktadır. Bugüne kadar 1200’ün üzerinde enzim tanımlanmıştır. Restriksiyon endonükleazların üç ayrı sınıfı bulunmaktadır. İşlev olarak birbirinden çok az farklılık göstermelerine rağmen, gen klonlanmasında, tip II restriksiyon endonükleazlar diğerlerine göre daha çok tercih edilen kesici enzimlerdir. Tip II restriksiyon endonükleazlar genellikle 4, 5 veya 6 baz çifti (bç) uzunluğunda olan spesifik bir nükleotid dizisini tanır ve bu dizilerdeki metillenmemiş çift-zincirli DNA molekülünü keser (115).

RFLP, bir restriksiyon endonükleaz ile DNA’nın kesilmesi üzerine dayandırılmış bir yöntemdir. Genetik hastalıkların moleküler genetik tanısında kullanılan önemli bir yöntemdir. Enzimin tanıma dizisinde birkaç nükleotid değişimi varsa, farklı kaynaklardan alınan DNA, bazı restriksiyon enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta DNA fragmentleri meydana gelir. Bu nedenle bu metod Restriksiyon Fragment uzunluk (Length) Polimorfizmi olarak adlandırılmaktadır. Tüm RFLP deneyleri, bir veya daha fazla restriksiyon enzim ile DNA’yı kesmeyi kapsar. Kesilen DNA parçaları direk boyama veya otoradyografi kullanılarak jel elektroforezi aracılığıyla büyüklüklerine göre ayrılır. Küçük fragmentler büyük fragmentlere oranla jel elektroforezinde daha hızlı hareket eder. Jel üzerine yüklenecek olan, baz çifti uzunlukları bilinen bir standart ile kalibrasyon eğrisi yapılarak bilinmeyen DNA parçasının moleküler ağırlığı hesaplanabilir. Bireysel DNA’lar arasındaki farklılıkların (polimorfizm) kaynağı, bölgeye özgü enzimin tanıma bölgesi içinde meydana gelen baz substitüsyonları veya inversiyon, insersiyon ve delesyonlar gibi yeniden dizi düzenlemeleridir. Böyle değişiklikler her bir birey için karakteristik bir örneği meydana

getirir ve bu durum bireyler arasındaki genetik polimorfizmi değerlendirmemizde bize yardımcı olur. RFLP analizi ile bir enzimi kodlayan gen bölgesindeki allel polimorfizmi tespit edilerek homozigot ve heterozigot allellerin sıklığı hesaplanabilir (116).

### **2.2.6. İnterferon-alfa alt tiplerinin gen polimorfizmleri ve hastalıklarla ilişkileri**

IFN- $\alpha$  genleri arasında dikkate değer bir genetik polimorfizm olduğu düşünülmektedir. RFLP analizleri yapılmış ve bu genler arasında yüksek derecede heterojenite olduğu görülmüştür. IFN genlerinin en son kabul edilen bilimsel adlandırmaya göre en az 51 IFN- $\alpha$  dizi varyantının listesi yapılmıştır. Bu varyantlar normal hücre hattı ve sıklıkla tümör hücre hatlarından elde edilen genomik DNA ve cDNA kütüphanelerinden elde edilmiştir. IFN- $\alpha$  gen ailesindeki farklılığın nedeni hem gen duplikasyonundan hem de allelik varyasyondan olabileceği görülmektedir (90).

IFN- $\alpha$  genleri farklı proteinler sentezlerler ve buna bağlı olarak dikkat çekici farklı aktivite profilleri ortaya çıkar. İlk çalışmalarda her bir IFN- $\alpha$  sitokin üretiminde bireysel farklılıkların olduğu ve sitokin uyarımına bağlı olarak, en yüksek ve en düşük sitokin üretimi arasında önemli farklılıklar olabildiği gösterilmiştir (117).

Kanser çalışmalarında genetik faktörlerin önemli ölçüde sitokin yapımını etkilediği ve doğal anti inflamatuvar sitokin profilinin hastalık gelişimine katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir. Transkripsiyonu etkileyen sitokin gen bölgelerinde yer alan polimorfizmlerin bireyler arası sitokin yapım miktarı değişikliklerinden bazılarının nedeni olabileceği bildirilmektedir (10).

IFN- $\alpha$  1 ve IFN- $\alpha$  2, bazı virüs enfeksiyonlarına karşı konağın oluşturduğu yanıtta genel olarak ortaya çıkan ana interferon türleridir. Otoimmün hastalıkların dışında hepatit türlerinde, çeşitli formüllerde, tercihen IFN- $\alpha$  2 ile geniş çaplı klinik çalışmalar yapılmaktadır. IFN- $\alpha$  2 geninde meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan ekspresyon farklılıklarının *Hepatit B Virüs* enfeksiyon seyrini etkileyebileceği ileri sürülmektedir (90, 117, 118).

IFN- $\alpha$  2 geninin promoter bölgesinde doğal olarak ortaya çıkan değişikliklerin özellikle -300 -300delAACTTT polimorfizminin genin transkripsiyonunu invitro olarak azalttığını gösterilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada, enfeksiyon hastalıkları ile bu polimorfizm arasındaki olası ilişkisini araştırmak amacıyla çeşitli popülasyonları kapsayan bir çalışma yapılmıştır (117, 119).

Viral enfeksiyonlara yanıtta ilgili diğer ilgi çekici interferon altipi de IFN- $\alpha$  5'dir. IFN- $\alpha$  5 karaciğer dokularında sentezlenen başlıca interfron alt tipi olmasına karşın kronik hepatit C olan hastaların karaciğerinde bu interferon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. IFN- $\alpha$  5'in potansiyel antiviral ve antiproliferatif özelliklerinin gösterildiği çalışmalara dayanarak kronik hepatitin tedavisinde bu gen ürününün bir rolü olabileceği varsayımları ileri sürülmektedir. Kronik hepatit C hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde, IFN- $\alpha$  5 ekspresyonunun diğer IFN- $\alpha$  tiplerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu hücreler *Hepatit C Virüsü (HCV)* için bir kaynak olarak işlev görmelerine karşın karaciğere göre daha düşük seviyede *HCV* replikasyonuna izin vermektedirler (120, 121).

Son dönemlerde yapılan bir çalışmada, sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalığında, SLE serumu aracılığıyla uyarılan normal insan periferik mononükleer kan hücrelerinin (PBMC) diğer viral uyarıcılar tarafından yapılan IFN- $\alpha$  alttiplerinden farklı olarak başlıca IFN- $\alpha$  1, IFN- $\alpha$  5 ve IFN- $\alpha$  21 mRNA sentezledikleri bildirilmiştir. IFN- $\alpha$  sentezinin bu özel kalıbının muhtemelen toll- like reseptörleri üzerinden iletilen sinyalden ve sentezlendiği hücre tipinden kaynaklandığı düşünülmüştür. SLE'ye yakınlıkta tip I interferon polimorfizminin önemli bir genetik belirteç olabileceği ileri sürülmüş, interferon beta 1 (rs1424855, rs1424856 ve rs1051922), IFN- $\alpha$  6 (rs614541 ve rs2383187), IFN- $\alpha$  19 (rs10119910), IFN- $\alpha$  17 (rs9298814), IFN- $\alpha$  21 (rs2939 ve rs1053887) bölgelerinden dokuzununbu hastalık ile pozitif bağlantılı olduğu görülmüştür (118). Yine SLE ile yapılan bir çalışmada interferon alfa alt tiplerinden IFN- $\alpha$  1 (-1823A>G), IFN- $\alpha$  2 (-3384A>G) ve IFN- $\alpha$  5'in (-2529T>A) promoter bölgelerinde yer alan bazı polimorfizmlerin genin ekspresyonuna etki eden transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkileyebileceği ileri sürülmüştür. Bu üç genin distal promoter bölgesinde yer alan SNP'lerin tümü, bu bölgeye IFN- $\alpha$ 'yı kontrol etmek için, bilinen herhangi bir transkripsiyon faktörünün bağlanmasını etkilememektedir. Buna karşın, kodlama yapmayan varyasyonlara sahip her bir gen içerisindeki bir haplotip blok (bu birlikteliğin genin içerisindeki diğer kodlama yapmayan varyasyonla bağlantılı olduğu muhtemeldir) gibi IFN genlerinin sentezini etkileyebileceği bildirilmiştir. Ayrıca IFN- $\alpha$  genlerinde 5' dizilerinin analizi, IFN- $\alpha$  promoter bölgesinde, IRF bağlanma bölgelerinden başka diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin bulunduğunu da göstermektedir (118).

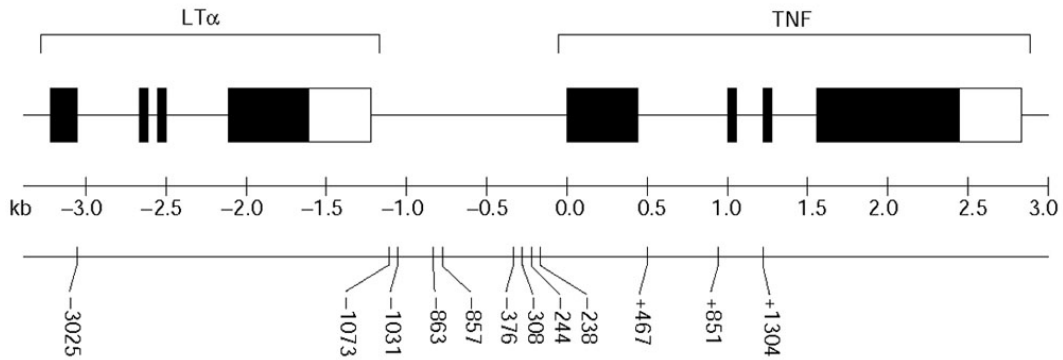
Başka bir araştırmada, IFN- $\alpha$  17 184Ile homozigot genotipinin fonksiyonel olarak önemli olabileceği ve İnsan Papilloma Virüsünün (*HPV*) etiyojisinde ve servikal kansere yatkınlığın belirlenmesinde önemli bir biyolojik belirteç olabileceği ileri sürülmüş ve 184Ile allelinin servikal kanser riskini artırdığı bulunmuştur. Bu polimorfizm; genin 551. nükleotidinde timinin yerine guanin; proteinin 184. aminoasitinde izolösün yerine arjininin geçmesiyle meydana gelmektedir. Fakat IFN- $\alpha$  genindeki bu polimorfizmin proteinin özgül aktivitesinde veya protein yapım miktarında değişiklik yapıp yapmadığı tanımlanmamıştır (10).

Ayrıca, Multiple Skleroz (MS) hastalarında IFN- $\alpha$  10 (Cys20stop], ve IFN- $\alpha$  17 (58stop) ve IFN- $\alpha$  17 Ile184Arg polimorfizimleri incelenmiştir. IFN- $\alpha$  17 (58stop) polimorfiziminde 58. aminoasitte stop kodonu oluşmakta, IFN- $\alpha$  10 (Cys20stop] polimorfiziminde ise, 60. nükleotid pozisyonunda timin nükleotidinin yerine adenin nükleotidinin geçmesi (transversiyon) meydana gelen polimorfizm sonucu *Sau3AI* restriksiyon bölgesi oluşmaktadır. Bu genin kodladığı proteinin 20. aminoasit pozisyonundaki sisteinini kodlayan TGT üçlü kodunu TGA kodanuna değiştirmekte ve yeni oluşan stop kodonu oluşmaktadır. IFN- $\alpha$  10 (Cys20stop] ve IFN- $\alpha$  17 (58stop) polimorfizimlerinde bu stop kodonları sinyal peptidi içerisinde transkripsiyon tamamlanmadan önce durdurmaktadırlar. Çalışma sonucunda fonksiyonel olmayan IFN- $\alpha$  17 alleli taşıyan hastaların MS gelişme risk artışına sahip oldukları bulunmuştur (96). Alman MS hastalarını kapsayan bu çalışmada IFN- $\alpha$  17 geninin 170. nükleotidinin bulunduğu bölgeye fazladan bir adenin nükleotidinin girmesiyle (insersiyon) çerçeve kaymasına (frame shift) neden olan yeni bir polimorfizm tanımlanmıştır. Fonksiyonel olmayan allel MS hastalarında tespit edilirken kontrol grubunda bulunmamıştır. Homozigot fonksiyonel olmayan allel sadece bir hastada görülmüş ve bu durumun açıklanmasında iki hipotez önerilmiştir: fonksiyon kazanımı ve allellik heterojenite. Birinci hipoteze göre; IFN- $\alpha$  1 ve IFN- $\alpha$  2 proteinleri, 16. aminoasitten 28. aminoasite kadar olan bölgede IFNAR1 ile direk etkileşime girmektedir. IFN- $\alpha$  17 içinde benzer bir reseptör bağlanma bölgesi varsayılabilir fakat sinyal peptidin proteolitik parçalanmasından sonra, polimorfizm sonucu 30 aminoasitlik bir güdük protein oluştuğundan, proteinin 24. ve 122. aminoasitleri arasında meydana gelen disülfit köprüleri oluşmadığından dolayı bu protein doğru katlanmaz ve reseptöre bağlanamaz. Bu künt proteinin, bozulmamış (intact) proteinin bağlanmasını engellemek için özel bir

fonksiyon kazanması olası değildir. İkinci hipoteze göre; fonksiyonel olmayan IFN- $\alpha$  17 geni için beklenen birleşik heterozigotinin olması çok daha olasıdır ve heterozigot hastalardaki ikinci IFN- $\alpha$  17 allelinin dizilemesine ihtiyaç duyulmaktadır. Üçüncü olasılık ise, hastalığı taşıyan bir bireyde yeni bir mutasyon olmasından dolayı, bu polimorfizm IFN haplotipini anlatmaktadır ve bu nedenle bu allel tercihen MS hastaları ve yakınlarında yayılım gösterebilmektedir (96).

### 2.2.9. TNF- $\alpha$ gen polimorfizmi ve diğer hastalıklarla ilişkisi

Sitokin ekspresyonu çoğunlukla transkripsiyonel düzeyde düzenlenmektedir. Genetik faktörler, proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin yapımında önemli bir etkiye sahiptirler ve enflamasyon olaylarında sitokin yapım miktarını tayin edebilirler. Bu düşünceden yola çıkarak, TNF- $\alpha$  geninin promotor bölgesinde birkaç polimorfizm tanımlanmıştır. TNF- $\alpha$  promotorunda yer alan polimorfizmlerin TNF- $\alpha$  yapım düzeyleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bunun dışında bu polimorfizmler birçok hastalıkta hastalığa yatkınlığın güçlü bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır (107).



Şekil 2.3 TNF geni üzerindeki polimorfik bölgeler (<http://genomebiology.com>)

TNF- $\alpha$  geninin promotor bölgesine ait -1031 (rs1799964), -863 (rs1800630), -357 (rs1800750), -308 (rs1800629), -238 (rs361525) ve kodlama bölgelerinden ilk intron bölgesine ait +489 polimorfizmleri çok sayıda araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Şekil 2.3). Genin promotor bölgesinde -238, -308 ve -376 pozisyonlarında polimorfizm olduğu bildirilmiştir. TNF- $\alpha$  promotor bölgedeki bu üç polimorfizmde G (Guanin) nükleotidi A (adenin) nükleotidiyle yer değiştirmektedir (104-110).

Fassmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada -308A alelinin yüksek promotor aktivitesi ve aşırı TNF- $\alpha$  üretiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (122). Tümör

nekroz faktör -308 promotor polimorfizminin, genin transkripsiyonel aktivitesine etkisini araştıran bir başka çalışmada, A aleli varlığının genin yüksek ifadesinden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (123, 124). Beyaz ırkın yaklaşık % 60 - %70 lik bir kısmında yabancı TNF1 (GG) genotipinin, %30 - %40 oranında heterozigot genotipin (GA) ve %1.5 - %3 sıklığında da varyant TNF2 (AA) genotipinin gözlendiği rapor edilmiştir (125-127).

Yapılan çalışmaların büyük bir bölümünde otoimmün hastalıklara yatkınlıkta ve serebral malarya, ülseratif kollitis, Crohn hastalığı, mukokutanöz leishmania, lepromatz lepra, septik şok ve ölümcül meningokokal hastalıklar gibi birçok enfeksiyonel hastalık ile TNF- $\alpha$  -308 ve diğer TNF- $\alpha$  gen polimorfizmlerinin ilişkili olduğu gösterilmiştir (izelge 2.6) (108, 128-131).



Çizelge 2.6 TNF- $\alpha$  gen polimorfizmleri ve enfeksiyon hastalıkları ile ilişkisi (131)

Polimorfizm	Enfeksiyon Hastalıklarıyla ilişkileri	Populasyon
rs1799964, rs1799724, <b>rs1800629</b> , rs361525, rs1800630, rs909253 <b>rs1800629</b> , rs361525, rs1800750	Tüberküloz ile bir birliktelik bulunamamış	Kuzey Hindistan
<b>rs1800629</b> , rs361525,	Tüberküloz ile bir birliktelik bulunamamış	Türkiye
<b>rs1800629</b>	MB (multibasillar) ve PB (paucibasillar) hastaları arasında haplotip sıklıklarında istatistiksel farklılıklar bulunamamış	Afrikan ve Avrupalı Brezilyalı
<b>rs1800629</b>	Sağlıklı kontrollerde GG sıklığı daha yüksek, kontrol grubuna göre cüzam hastalarında GA/AA genotip sıklığının azaldığı bulunmuştur	Brezilya
<b>rs1800629</b>	rAOM'nin (recurrent akut otitis media) daha yüksek semptom skoru	Amerika
<b>rs1800629</b>	TNF2 alleli septik şoka ve mortaliteye yatkınlık gösterme ile güçlü birliktelik gösterdiği bulunmuştur	Fransa
<b>rs1800629</b> , rs2430561	rs1800629, G/A genotip sıklıklarında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Kontrol grubuna göre MSF (Mediterranean spotted fever) hastalarında rs2430561 TT genotipi artmış IFN-gama yapımı ile birliktelik gösterdiği ve kontrol grubuna göre MSF hastalarında anlamlı olarak daha az sıklıkta olduğu bulunmuştur.	Sicilyalı
<b>rs1800629</b>	Kronik HBV (hepatit B virüs) enfeksiyon gelişimi ile birliktelik göstermediği bulunmuştur.	İran
rs1799964, rs1800630, -572(A/C), <b>rs1800629</b> , rs361525	Üç Populasyon arasında rs1799964, rs1800630, -572(A/C), rs1800629 ve rs361525'de TNF- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ : tümör nekroz faktör alfa) genotip dağılımında farklılık olmadığı; -204 lokusunda TT genotipi ile karşılaştırıldığında CT genotipinin SARS'a (ağır akut solunum sendomu) karşı koruyucu bir etki ile ilişkili olduğu bulunmuştur.	Çin
rs361525	rs361525 ve LTA (lenfotoksin alfa) haplotipi ikincil dengue kanamalı ateşi olan hastalarda anlamlı olarak arttığı bulunmuştur.	Taylantlı
<b>rs1800629 G (TNF1), rs1800629 A (TNF2)</b>	TNF2'nin CM'ye (cerebral malarya) yatkınlık ile ilişkili olmadığı; rs1800629 genotipleri ve allellerinin CM ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılığı olmadığı bulunmuştur.	Orta sudan
rs1799964, rs1799724, rs1800750, <b>rs1800629</b> , rs361525	Malarya ve kontrol grupları arasında hem -1031 hem de -863 genotipleri arasında TNF alfa düzeyinde anlamlı farklılıklar görüldüğü bulunmuştur.	Hindistan
<b>rs1800629</b>	MLC (mukokutaneus leishmania) hastalarında anlamlı olarak daha yüksek rs1800629 allel 2 genotip sıklığı gözlemlenmiştir.	Venezuela
<b>rs1800629</b>	Chagas hastalığı ile TNF- $\alpha$ polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.	Brezilyalı
<b>rs1800629</b>	Toksoplazmik retinokoroitidis (TR) ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. bu genotipte anlamlı farklılık bulunamamıştır.	Brezilyalı
<b>rs1800629</b> , rs361525	rs1800629 AA genotipi OLP'ye (oral lichen planus) yatkınlık ve hastalığın şiddeti üzerine etki etmektedir.	Taylantlı

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan cihazlar

- Masaüstü makro santrifüj (Mistral 1000 MSE)
- Masaüstü mikro santrifüj (Msc Micro Centaur)
- Hassas tartı (Denver Instrumen Company)
- Manyetik karıştırıcı (BIBBY Stuart)
- Vorteks (Clifton Cyclone)
- PH metre (Metle Toledo MP 2200)
- Mikrodalga fırını (BEKO MD 1500)
- Otomatik pipet (Accu-Jet)
- Mikropipetler -10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl- (Gilson ve Thermo)
- Fanlı ekonomik inkübatör (Gallenkamp)
- Spektrofotometre (UV1800 Shimatzu)
- Hot blok (Techne)
- Thermal cycler (Gen Amplifikasyon PCR 9700 applied biosystems)
- Elektroforez güç kaynağı (EC 1000-90)
- Yatay elektroforez sistemi (Whatman Biometra)
- Dikey elektroforez sistemi (EC120 Mini vertical gel system)
- Jel görüntüleme (Vilber lourmat photodocumentation and video graphic printer UP-895CE)
- Laminalflow kabin (Steril-Vbh)

#### 3.2. Kullanılan plastik malzemeler

- 0,2 ml ve 2,0 ml Mikro santrifüj tüpleri (Axygen)
- 15 ml ve 50 ml Konik uçlu falkon Tüpleri (LP's)
- 0,5–10 µl, 1–200 µl, 100–1000 µl Mikropipet uçları (Axygen)
- 5 ml, 10 ml, 25 ml Plastik pipetler (LP Italiana SPA)
- DNA saklama kutusu (Heathrow)

#### 3.3. Kullanılan kimyasal maddeler

- Tris bazı (Sigma)

- Borik asit (Merck)
- TEMED ((Applichem)
- APS (Applichem)
- Akrilamid (Merck)
- Bis akrilamid (Biomatic)
- Asetik asit (E-Merck)
- EDTA (Sigma)
- %96'lık Absolü Alkol (Riedel- de Haen)
- Primer sentezleri (Heliks)
- dNTP karışımı (Fermentas)
- MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)
- PCR tamponu (Fermentas)
- *Taq* DNA Polimeraz (Fermentas)
- TasI (Tsp509I)Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- B (Blue) tamponu (Fermentas)
- Bsp143I (Sau3AI) Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- Bsp143I tamponu (Fermentas)
- NcoI Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- Agaroz (Prona)
- Low Melting agaroz (Prona)
- Formamid (Sigma)
- Xylene Cyanol (Sigma)
- Bromfenol Blue (Bio Basic Inc.)
- Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
- Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas)
- Etidyum bromür (Applichem)

### **3.4. Kullanılan solüsyonlar ve tamponlar**

#### **3.4.1. TE tamponu (Tris-HCl, EDTA):**

10 mM Tris-HCl 0.394 g, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA 0.093 g 250 ml ultra saf suda çözdürülerek otoklavda steril edildi.

#### **3.4.2. TAE tamponu: (50X TAE stok tamponu için)**

Tris 242 g, EDTA 100 ml 0.5 M pH: 8.0, Glasial Asetik Asit 57,2 ml, 1000 ml bidistile su ile tamamlanarak çözdürüldü. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında bırakıldı.

#### **3.4.3. %30 Akrilamid solüsyonu**

29 g Akrilamid ve 1 g N,N'-metilenbisakrilamid 100 ml bidistile su içerisinde çözdürüldü. Filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılincaya kadar koyu renkli şişe içerisinde oda sıcaklığında saklandı.

#### **3.4.4. 5X TBE tamponu**

54 g Tris, 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH: 8.0) 1 litre bidistile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

1X TBE çalışma tamponu hazırlamak için; hazırlanmış olan 5X TBE tamponundan 20ml alınıp ve üzerine 80 ml bidistile su eklenerek 100 ml'ye tamamladı.

#### **3.4.5. %10 Amonyum persülfat**

1 g amonyum persülfat alınarak 10 ml bidistile suda çözdürüldü. Aynı gün içerisinde kullanılincaya kadar +4 °C'de saklandı (APS +4 °C'de birkaç hafta da saklanabilir).

#### **3.4.6. Yükleme tamponu (Loading dye)**

Formamid (%95) 9.5 ml, Xylen Cyanol (%0.5) 0.05 g, Bromfenol Blue (%0.5) 0.05 g 15 ml'lik konik falkon santrifüj tüpü içerisine konularak vortekste karıştırıldı. Kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

#### **3.4.7. dNTP çalışma solüsyonu: (2.5 mM stok çözeltisi için)**

100 mM Adenin, Timin, Guanin, Sitozin nükleotidlerinin her birinden 2.5 µl alınarak 90 µl ultrasaf su ile karıştırılarak 2.5 mM'lık 100 µl dNTP çalışma solüsyonu hazırlandı.

#### **3.4.8. Primer stoklarının hazırlanması:**

- Forward primerleri: 100 pmol/µl'lik ana stoktan çalışma solüsyonu, konsantrasyonu 100µl 10 pmol olacak şekilde 90 µl distile suya 10 µl forward primeri eklenerek hazırlandı.

- Reverse primerleri: 100 pmol/ $\mu$ l'lik stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 100  $\mu$ l 10 pmol olacak şekilde 90  $\mu$ l distile suya 10  $\mu$ l reverse primeri eklenerek hazırlandı.

### **3.5. Çalışma grubu**

#### **3.5.1. Hasta grubu**

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'na 2010 tarihlerinde KKKA ön tanısı ile yatırılarak takip ve tedavi edilmiş hastalardan KKKA kesin tanısı konmuş toplam 134 erişkin birey ve 2007 yılına ait 16 KKKA kesin tanıli hasta DNA'sı çalışmaya alınmıştır (Ek-1: karar no:2011/23). Olgu tanımlama; T.C. Sağlık Bakanlığı ve KKKA çalışma gurubu tarafından oluşturulan KKKA olgu tanımlama kriterlerine göre yapılmıştır;

#### **1. KKKA için epidemiyolojik risk faktörü hikayesi olan hastalar:**

- a.* Kene teması (Kene ile ısırılma, kene kırma öyküsü) ve/veya
- b.* KKKA için epidemik olan bölgeye seyahat veya o bölgede yaşama öyküsü

#### **2. Viral Kanamalı Ateşi düşündüren akut hastalık tablosu:**

- a.* Ateş (aksiller,  $>38$  °C) ve trombositopeni (kan trombosit sayısı  $<150 \times 10^9$  hücre/L) ve/veya
- b.* Hemorajik manifestasyonlar (ekimoz, purpura, peteşi, gastrointestinal kanamalar, epistaksis, kan alınan vücut bölgelerinden kanamalar veya kadınlarda adet dışı vajinal kanamalar)

Kan örnekleri alınmadan önce çalışma grubunda belirtilen kriterlere sahip bireylerden, etik kurul kararı (karar no:2010/23) ile izin alınarak hazırlanan bilgilendirilmiş olur formu imzalatılmıştır (Ek-2, Ek-3 ve EK-4).

#### **3.5.2. Kontrol grubu**

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kan Bankasına 2010 yılında başvuran,

- Aynı yörede bulunan,
- Yaşam özellikleri benzer,

- Yaş ve cinsiyetleri hasta grubu ile uyumlu,
- Bilinen hepatik, renal ve pankreatik yetmezlik, gastrointestinal, akut kardiyovasküler, serebrovasküler hastalık ve hipertiroidizm öyküsü mevcut olmayan, toplam 170 sağlıklı gönüllü erişkin erkek ve kadınlar arasından kontrol grubu oluşturulmuştur.

Kan örnekleri alınmadan önce kontrol grubunda belirtilen kriterlere sahip bireylerden, etik kurul kararı ile izin alınarak hazırlanan bilgilendirilmiş olur formu imzalatılmıştır (Ek-2, Ek-3 ve EK-5).

### **3.6. Örneklerin alınması**

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Uygulama Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları kliniğine başvuran, KKKK ön tanılı çalışmaya alınan hastalardan yatışı takiben; ayrıca hastanemiz Kan Bankası'na gelen kan donörlerinden (kontrol grubu) gerekli form ve izin belgeleri doldurtulup imzalatıldıktan sonra DNA ekstraksiyon işlemi yapılmak üzere, 4 ml periferik venöz kan alınarak -20°C'de derin dondurucuda çalışma yapılncaya kadar saklanmıştır.

### **3.7. Kan örneklerinden DNA eldesi**

DNA ekstraksiyon kiti (Nukleo Spin Blood, Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak kan örneklerinden total genomik DNA elde edilmiştir.

- 200 µl kan, 25 µl Proteinaz K (Macherey-Nagel, Almanya) (6 mg Proteinaz K ve 260 µl PB Buffer ) ve 200 µl B3 tamponu 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konularak, vorteks ile 10- 20 saniye karıştırıldıktan sonra 70 °C'de 15 dakika bekletilmiştir.
- Her örneğe 210 µl etanol eklenerek vorteksde 10 saniye karıştırılmıştır.
- Ürünler, Nucleo Spin Blood Column (NSBC)'a yüklenerek 11000 devir/dakikada 2 dakika santrifüj edilerek lizatın tam süzülmesi sağlanmıştır.
- NSBC'a 500 µl BW eklenerek 11000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- NSBC'a 600 µl B5 eklenerek 11000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- NSBC'yi yeni tüpe alınarak 11000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır.

- 1,5 µl'lik ependorf tüpe NSBC yerleştirilmiştir. Üzerine önceden ısıtılmış BE tamponu 100 µl eklenerek 1 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 11000 devir/dakikada 1 dakika santrijüj edilmiştir. Bu işlemler sonunda elde edilen DNA çözeltileri etiketlenerek -20°C'de saklanmıştır.

### 3.8. Genotipleme

IFN- $\alpha$  gen ailesinde IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A ve IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) gen polimorfizmleri ile TNF- $\alpha$  -308 G>A gen polimorfizm analizi için PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. PCR amplifikasyonları için kullanılan PCR tepkime karışımı çizelge 3.1'de, PCR tepkime koşulları çizelge 3. 2.'de verilmektedir.

Ayrıca PCR tepkimesi için seçilen primer dizileri, primerlerin yapışma sıcaklıkları ve elde edilen DNA fragment uzunlukları çizelge 3. 3'de, RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon enzimleri, RFLP sonrası elde edilen fragmentlerin uzunlukları çizelge 3. 4'de gösterilmektedir.

Bu polimorfizmler için RFLP yönteminde kullanılacak restriksiyon enzimlerinin enzime özgü tamponların isimleri ve RE tanıma bölgeleri;

#### **IFN- $\alpha$ 5 -2529 T>A Polimorfizmi:**

TasI (Tsp509I)  $\rightarrow$  5'- $\downarrow$ AATT-3'

3'- TTAA $\uparrow$ -5'

#### **IFN- $\alpha$ 10 Cys20>stop Polimorfizmi:**

Bsp143I (Sau3AI)  $\rightarrow$  5'- $\downarrow$ GATC-3'

3'- CTAG $\uparrow$ -5'

#### **TNF- $\alpha$ -308 G>A Polimorfizmi:**

NcoI  $\rightarrow$  5'-C $\downarrow$ CATGG-3'

3'-GGTAC $\uparrow$ C-5'

#### **3.8.1. Restriksiyon enzimleri ile yapılan tepkime karışımlarının hazırlanması**

Her üç polimorfizm için elde edilen PCR örneklerinden 8 µl ependorf tüplere alınarak üzerine 1 µl RE, 1 µl X10 RE tamponu (TasI RE için Buffer B, Bsp143I RE için Buffer Bsp143I, NcoI RE için Buffer tango kullanıldı) eklenerek toplam 10 µl tepkime karışımı 37 °C'de 16-20 saat bekletilerek RFLP yöntemi uygulandı.

Çizelge 3.1 Gen polimorfizmleri için PCR tepkime karışımı

Solüsyonlar	Konsantrasyon	Miktar
PCR tamponu	1X	2.5 µl
dNTP karışımı	2 mM	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 µl
Forward primeri	10 pmol	1 µl
Reverse primeri	10 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	5 U/µl	0.5 µl
dH <sub>2</sub> O	-	15 µl
DNA	100 ng/µl	1µl

Çizelge 3.2 Gen polimorfizmleri için PCR tepkime koşulları

Gen	Polimorfizm	Başlangıç zincir ayrılma aşaması	Zincirlerin ayrılması aşaması	Primerlerin Yapışma aşaması	Zincir Sentez aşaması	Son zincir sentez aşaması	Tepkime Döngüsü
IFN-α 5	-2529 T>A	94 °C—5dk	94 °C—30sn	62°C—45sn	72 °C—30sn	72 °C—5dk	35
IFN-α 10	Cys20>stop	94 °C—5dk	94 °C—1dk	68 °C—1dk	72 °C—1dk	72 °C—5dk	28
TNF-α	-308 G>A	95 °C—5dk	95°C—30sn	58 °C—30sn	72 °C—45sn	72 °C—10dk	35



Çizelge 3.3 PCR tepkimesinde kullanılan primer dizileri, primerlerin yapışma sıcaklıkları ve DNA parça uzunlukları

Gen	Polimorfizm	Primer Dizileri (5'→3')		DNA parça uzunluğu (bç)	Primer yapışma sıcaklığı F (°C) R	
		Forward	Reverse		F	R
IFN- $\alpha$ 5	-2529 T>A	TAAAGGACACTTCCCCCAAT	AATGGTGGGTAGGTATATGGTAGG	201	55.3	61.0
IFN- $\alpha$ 10	Cys20>stop	GGCCCTGTCCTTTTCTTTACTT	ATCAAACCTCCTCCTGGGGGAT	199	58.4	59.8
TNF- $\alpha$	-308 G>A	TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	107	63.4	60.6

\*Forward (F) ve reverse (R) primerleri için yapışma sıcaklıkları gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve RFLP sonrası DNA parça uzunlukları

Gen	Polimorfizm	Restriksiyon Endonükleaz	Homozigot Doğal Tip Allel	DNA parça uzunluğu (bç)	Homozigot Polimorfik Allel	DNA parça uzunluğu (bç)
IFN- $\alpha$ 5	-2529 T>A	<i>TasI (Tsp509I)</i>	T alleli	129 + 55 + 17	A alleli	184 + 17
IFN- $\alpha$ 10	Cys20>stop	<i>Bsp143I (Sau3AI)</i>	Allel 1	129 + 70	Allel 2	129 + 56 + 14
TNF- $\alpha$	-308 G>A	<i>NcoI</i>	G alleli	87 + 20	A alleli	107

### **3.9. Jel elektroforezi**

PCR ürünleri için %1'lik, RFLP ürünleri için %3'lük agaroz jel ve %12.5'lik denatüre olmayan poliakrilamid jel kullanıldı.

#### **3.9.1. Agaroz jelin hazırlanması:**

140 ml'lik jel tankında %1 (RFLP için %3) yoğunlukta agaroz jeli hazırlamak için 1.4 g (RFLP için; 4.2 g) agaroz tartılarak 250 ml'lik erlenmayer içine kondu. Üzerine X50 yoğunlukta olan TAE tamponundan (Tris-HCL, Borik asit, EDTA) X1 (2 ml X50 yoğunlukta TAE tamponuna 98 ml bidistile su eklenerek hazırlanır) yoğunlukta hazırlanan 140 ml TAE tamponu konuldu ve mikrodalga fırınında ısıtılarak berraklaşması sağlandı. Berraklaşan jelin el yakmayacak sıcaklığa düşürülmesi için akan musluk altında soğutuldu. Jel içerisine 5 µl etidium bromür (EtBr) eklenerek boyanması sağlandı ve 140 ml'lik agaroz jel tankına döküldü. Kuyucuk oluşturmak için taraklar yerleştirildi ve jelin donması beklendi.

#### **3.9.2. Agaroz jelde PCR ve RFLP ürünlerinin koşturulması**

6 µl PCR ürününe 2 µl yükleme tamponu eklendi. Toplam 8 µl karışım kuyucuklara yüklendi. DNA fragmentlerinin baz çifti uzunluklarını karşılaştırmak için 50 baz çifti (bç) ve 100 bç'lik DNA belirteçleri kullanıldı. 2 µl alınan belirteç 1 µl distile su ve 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Yüklene DNA'lar 100 voltta 50 dakika koşturuldu ve UV altında görüntülendi.

#### **3.9.3. Denatüre olmayan poliakrilamid jelin hazırlanması**

Dikey elektroforez tankına uygun boyuttaki camlar iyice yıkanıp önce distile su ile daha sonrada %99 etanol ile iyice silindi. İki cam arasına 1 mm kalınlığındaki aralık oluşturucu şeritler aynı hizada olacak şekilde yerleştirildi. Üst üste kapatılan camlar dikkatlice jel dökme çerçevesine yerleştirildi.

10 ml %12.5'lik poliakrilamid jel hazırlamak için; 4 ml %30 Akrilamid/bisakrilamid stok solüsyonu (29:1), 3.93 ml bidistile su, 20 ml 5X TBE tamponu, 70 µl %10 Amonyum persülfat ve 3.5 µl TEMED kullanıldı. TEMED eklenmeden önce hazırlanan karışımın havası alındı. Daha sonra polimerizasyonu başlatan TEMED ilave edildi. Jel solüsyonu hızlıca, hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek iki cam arasına

döküldü. Tarak dikkatlice yerleştirilip, jel polimerleşmeye bırakıldı. Polimerizasyon için yaklaşık 30-45 dakika yeterli oldu. Polimerizasyondan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı. Kuyularda akrilamid kalıntısı kalabileceği için enjektör yardımıyla kuyular TBE tamponuyla yıkandı. Elektroforez işlemini başlatmak için aparat tankın içine yerleştirildi. Jelin alt ve üst sınırlarına temas edecek şekilde tanka 1 X TBE tamponu eklendi.

#### **3.9.4. Örneklerin poliakrilamid jele yüklenmesi, yürütülmesi ve boyanması**

5 µl PCR ürünü 1 µl 6X yükleme tamponu ile 10 µl RE kesim ürünleri 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 120 voltta 35 dakika elektrik akımına maruz bırakılarak koşturuldu. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra iki camın arası açılarak jel dikkatlice EtBr boyama solüsyonuna alındı. Yaklaşık 2-5 dakika boyandıktan sonra fazla boyanın uzaklaştırılması için saf su içinde yıkandı. Daha sonra jel görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında görüntülendi.

### **4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Çalışmamızda istatistiksel analiz, SPSS 15.0 paket bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Bu program kullanılarak; Independent-Samples T testi ve varyans analizi ve Tukey HSD çoklu karşılaştırma yöntemi ile hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin yaş ortalamaları karşılaştırılmış,  $\chi^2$  testi ile hasta ve kontrol grupları arasındaki genotip sıklıkları hesaplanmıştır. Ayrıca %95 güvenlik aralıklarında (CI= Confidence Interval) *Fisher exact* testi ile risk oranları (OR:Odds Ratio) belirlenmiştir.

Hasta ve kontrol gruplarının Hardy-Weinberg dağılımına uygunluk gösterip göstermediği de kontrol edilmiştir.

## 5. BULGULAR

### 5. 1. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin demografik özelliklerinin değerlendirilmesi

Çalışmamızda 2010 yılına ait toplam 150 KKKA kesin tanısı konmuş hasta ile 170 sağlıklı-gönüllü birey (kontrol grubu) değerlendirmeye alınmıştır. 150 KKKA hastasının 33'ü ağır, 117'si hafif olgu olarak belirlenmiştir. Ayrıca hastaların 19'u ölmüş, 131 birey sağlıklı olarak taburcu edilmiştir.

Hasta ve kontrol grubuna ait demografik özellikler çizelge 5.1'de verilmektedir. Yaş dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu *independent t testi* ile, yaşayan-ölen hastaların ve kontrol grubunun yaş ortalamaları da *varyans analizi (Oneway ANOVA)* ve *Tukey HSD çoklu karşılaştırma yöntemi* ile değerlendirilmiştir. Değerlendirilme sonrasında yaş dağılımı açısından hasta ile kontrol grubu arasında fark bulunmazken ( $p>0.05$ ), ölen hastaların yaşlarının yaşayan hastalara ve kontrol grubuna oranla daha büyük olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

Ağır olguların yaşları hafif olgularla karşılaştırıldığında, sırasıyla  $46.55\pm 18$ ,  $46.16\pm 19$  olarak tespit edilmiştir. Yaş ortalamaları açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında bir fark olmadığı belirlenmiştir ( $p=0,90$ ).

Cinsiyet dağılımı  $\chi^2$  testi (*Fisher's Exact Testi*) ile değerlendirilmiş, hem hasta-kontrol grubu arasında, hem ağır-hafif olgular, hem de ölen-yaşayan hastalar arasında fark olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ). Yaş ve cinsiyet dağılımı açısından kontrol grubumuz hasta grubu ile benzerdir.

Hasta grubunda yer alan bireylerin %98'i kırsal kesimde yaşamaktadır ve hastaların %94.7'sinde kene ile temas öyküsü mevcuttur.

Hasta grubunda yer alan bireyler mesleki açıdan değerlendirildiğinde kadınların hepsinin ev hanımı olduğu, erkeklerin ise çiftçilik ve hayvancılıkla uğraştıkları tespit edilmiştir.

Çizelge 5.1 KKKA hastaları ve kontrol gurubuna ait demografik özelliklerinin karşılaştırılması.

<b>Değişkenler</b>	<b>Yaşayan hastalar (n=131)</b>	<b>Ölen hastalar (n=19)</b>	<b>P değeri</b>	<b>Ağır Olgular (n=33)</b>	<b>Hafif Olgular (n=117)</b>	<b>P değeri</b>	<b>Tüm hastalar (n=150)</b>	<b>Kontrol grubu (n=170)</b>	<b>P değeri</b>
Yaş (yıl)	45.14±18	54.00±18		46.55±18	46.18±19		46.26±18	43.09±10	
Ortalaması±SD			0.01			0.92			0.06
Yaş Sınırları	17-82	18-80		18-80	17-82		17-82	18-70	
<b>Cinsiyet, n(%)</b>									
Erkek	55 (42.0)	10 (52.6)		14 (42.4)	51 (43.6)		65 (43.3)	90 (52.9)	
Kadın	76 (58.0)	9 (47.4)	0.15	19 (57.6)	66 (56.4)	1.00	85 (56.7)	80 (47.1)	0.09
<b>Risk Faktörleri, n(%)</b>									
Kentte yaşama	3 (2.3)	0 (0)		1 (3)	2 (1.7)		3 (2)		
Kırsalda yaşama	128 (97.7)	19 (100)	1.00	32 (97)	115 (98.3)	0.52	147 (98)		
Kene teması var	129 (98.5)	13 (68,4)		28 (84.8)	114 (97.4)		142 (94.7)		
Kene teması yok	2 (1.5)	6 (31,6)	0.01	5 (15.2)	3 (2.6)	0.01	8 (5.3)		

Çizelge 5.2 Yaşayan-ölen ve ağır-hafif KKKK hastalarında görülen laboratuvar bulgularının ortalamalarının karşılaştırılması

<b>Laboratuvar Bulguları</b>	<b>Ağır Olgular n=33 (üst-alt değer)</b>	<b>Hafif Olgular n=117 (üst-alt değer)</b>	<b>Ölen Hastalar n=19 (üst-alt değer)</b>	<b>Yaşayan Hastalar n=131 (üst-alt değer)</b>	<b>Tüm Hastalar n=150 (üst-alt değer)</b>	<b>Referans değeri</b>
Lokosit (x10 <sup>9</sup> /L)	5.6 (0.8-27)	2.7 (0.7-10)	5.1 (0.7-22)	3.1 (0.7-27)	3.4 (0.7-27)	4.0-11.0
Trombosit (x10 <sup>9</sup> /L)	24.3 (8-71)	96.1 (10-231)	36.1 (10-86)	86.7 (8-231)	80.3 (8-231)	150-450
aPTT (s)	34.8 (9.7-151)	13.9 (9.4-58)	45.4 (10-151)	14.6 (9.4-151)	18.5 (9.4-151)	25.1-34.7
INR (s)	1.0 (0.8-2.4)	1.0 (0.7-1.6)	1.2 (0.8-2.4)	1.0 (0.7-1.6)	1.0 (0.7-2.4)	
AST (U/L)	868 (168-2439)	127 (14-607)	585 (82-1847)	247 (14-2439)	290 (14-2439)	9-36
ALT (U/L)	286 (42-1076)	53 (12-193)	188 (67-661)	92 (12-1076)	104 (12-1076)	10-28
Fibrinojen (µg/dl)	210 (46-326)	260 (138-393)	206 (89-299)	314 (46-393)	340 (46-393)	

aPTT: aktif parsiyal tromboplastin zamanı, INR: international normalized ratio, AST: aspartat aminotransferaz, ALT: alanin aminotransferaz.

Ağır-hafif olgu tanımlamaları Swanepoel, Çevik, Bakır ve arkadaşlarının çeşitli çalışmalarında belirlediği kriterlere göre yapılmıştır (61, 42, 63). Hasta grubu ile yapılan değerlendirme sonrasında; 33 ağır olgu olarak değerlendirilen 13 KKKA hastasının öldüğü, 6'sının sağlıklı olarak taburcu edildiği tespit edilmiştir. Hafif olgu olarak değerlendirilen 117 KKKA hastasından ise 6 birey ölmüş 11 birey sağlıklı olarak taburcu edilmiştir. Bu değerler istatistik açıdan oldukça anlamlı bulunmuştur ( $p=0.0001$ ). Bu verilerden yola çıkılarak hafif olgulara oranla ağır olgularda mortalite gelişme riskinin 12.04 (4.09-35.34) kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu değer istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ).

Tüm KKKA hastalarının akut dönemde elde edilen laboratuvar bulgularının ortalama değerleri çizelge 5.2'te verilmiştir. Genel olarak bakıldığında kötü prognoz göstergelerinden biri olan lökosit seviyesinin bazı hastalarda düşük bazı hastalarda ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ölen hastalarda yaşayan hastalara oranla ortalama lökosit sayısı daha yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Ağır-hafif olguların seçiminde tek başına belirleyici bir kriter olarak değerlendirmedimiz trombosit sayısının, değişen diğer laboratuvar bulgularının yanı sıra ağır olgularda ve ölen hastalarda oldukça düşük olduğu görölmüştür. Elde edilen değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Karaciğer bozukluğunun göstergesi olan AST; ALT değerlerinin de ölen hastalarda daha yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu değerlerin istatistik açıdan anlamlı olduğu görölmüştür ( $p=0.001$ ).

KKKA hastalarında, kanama-pıhtılaşma bozukluğu belirteçleri arasında yer alan düşük trombosit sayısı, INR ve aPTT sürelerinin uzaması ve düşük fibrinojen miktarı ölen ve yaşayan hastalar arasında yapılan karşılaştırmada net olarak görülebilmektedir. Bu laboratuvar bulgularının istatistiksel olarak değerlendirmesi yapıldığında; hem ağır-hafif olgular hem de ölen-yaşayan hastalar arasında anlamlı olarak farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

Tüm KKKA hastaları kanama bulgusu yönünden değerlendirildiğinde 59 (%39.3) hastada kanama (ekimoz, peteşi, melena vb) olduğu, 91 (%60.7) hastada kanama bulgusu olmadığı belirlenmiştir. 33 ağır olgudan 19'unda (%57.6), 19 ölen hastanın 13'ünde (%68.4) kanama bulgusu olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistik açıdan değerlendirildiğinde, hem ağır-hafif olgular ( $p=0.02$ ) hem de

ölen-yaşayan hastalar ( $p=0.01$ ) arasında laboratuvar değerleri ile paralel olarak kanama bulgusu yönünden anlamlı bir fark olduğu görülmektedir.

## **5.2. PCR ve RFLP ürünlerin genotiplerinin değerlendirmesi**

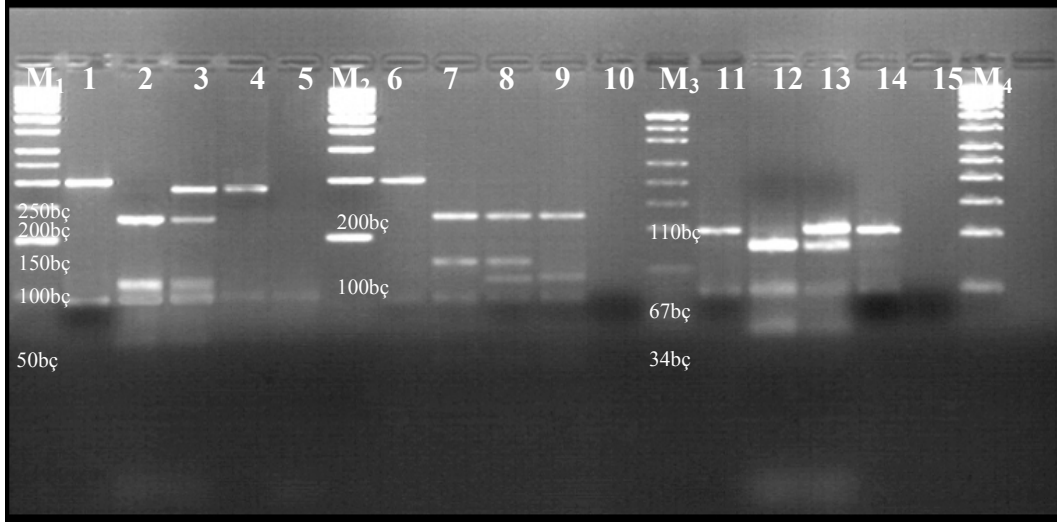
### **5.2.1. IFN- $\alpha$ 5 -2529 T>A polimorfizmi**

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin tam kanlarından DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak elde ettiğimiz DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonrası 201 bç büyüklüğünde bir DNA parçası elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürününde, Tsp 509I restriksiyon enziminin iki tanıma bölgesi vardır. Homozigot TT doğal genotipinde; RE ile muamele edildiğinde, PCR ürünü iki bölgeden kesilerek 129+55+17 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edilmiştir. IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A polimorfizminde T nükleotidinin yerini A nükleotidinin alması sonucunda Tsp 509I restriksiyon enziminin bir tanıma bölgesi ortadan kalkmakta ve bu RE enzimi 201 bç'lik DNA parçasını sadece bir bölgeden kesmektedir. Sonuçta AA polimorfik genotipi için 184+17 bç uzunluklarında iki DNA parçası elde edilir. Heterozigot TA genotipinde ise 184+129+55+17 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edilmiştir (şekil 5.1).

### **5. 2. 2. IFN- $\alpha$ 10 Cys20>stop (T>A) polimorfizmi**

Çalışma grubunda yer alan bireylerin DNA'ları kullanılarak yapılan PCR sonrası 199 bç büyüklüğünde bir DNA parçası elde edilmiştir. Bsp 143I (Sau 3AI) RE'nin PCR ürününde bir tanıma bölgesi vardır. DNA parçası Bsp 143I (Sau 3AI) restriksiyon enzimi ile muamele edildiğinde 199 bç'lik DNA parçası bir bölgeden kesilerek homozigot allel 1 (TT) doğal tip genotipi için 129+70 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edilmiştir. IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop polimorfizminde (60. nükleotid) T nükleotidinin yerini A nükleotisinin alması sonucunda 70 bç uzunluğundaki DNA parçası içerisinde bir tane daha Bsp 143I RE'nin tanıma bölgesi olduğundan polimorfik allel 2 (AA) için 129+56+14 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edilmiştir. Heterozigot TA genotipi için 129+70+56+14 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edilmiştir (şekil 5.1 ve şekil 5.2).





Şekil 5.1 IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A, IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) ve TNF- $\alpha$  308G>A gen polimorfizmlerinin PCR ve RFLP ürünleri agaroz jel üzerinde gösterimi.

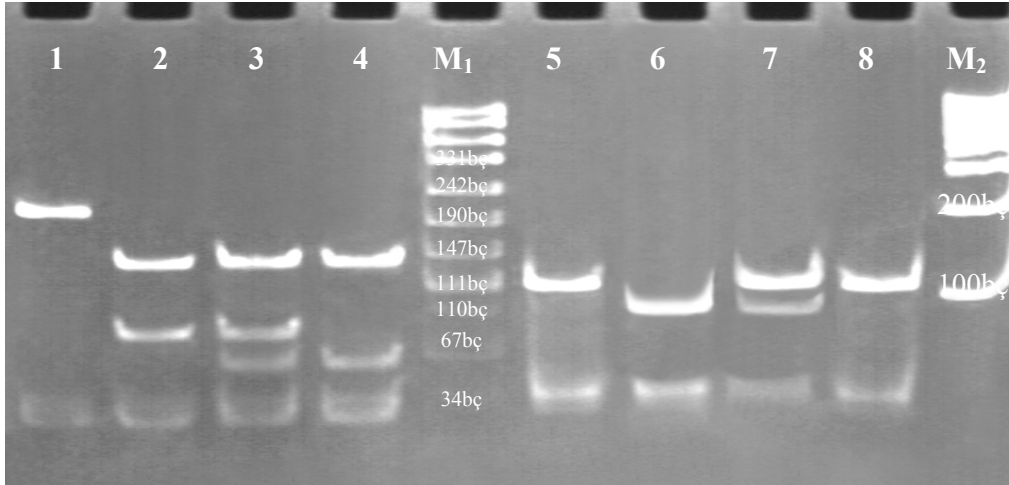
1-4: IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A gen polimorfizmi [1-PCR ürünü (201 bç), 2-homozigot doğal tip TT alleli (129+55+17 bç), 3-heterozigot TA alleli (184+129+55+17 bç), 4-homozigot polimorfik AA alleli (184+17 bç)];

6-9: IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) gen polimorfizmi [6-PCR ürünü (199 bç), 7-homozigot doğal tip TT alleli (129+70 bç), 8-heterozigot TA alleli (129+70+56+14 bç), 9-homozigot polimorfik AA alleli (129+56+14 bç)];

11-14: TNF- $\alpha$  -308G>A gen polimorfizmi [11-PCR ürünü (107 bç), 12-homozigot doğal tip GG alleli (87+20), 13-heterozigot GA alleli (107+87+20), 14-homozigot polimorfik AA alleli (107 bç)]; 5,10, 15: Negatif kontrolleri; M<sub>1</sub>ve M<sub>3</sub>: Marker (50bç DNA leader), M<sub>2</sub>: Marker (pUC19).

### 5. 2. 3. TNF- $\alpha$ -308G>A polimorfizmi

TNF- $\alpha$  geninin promoter bölgesinin çoğaltılabilmesi için hazırlanan primerler kullanılarak yapılan PCR sonrası 107 bç büyüklüğünde bir DNA parçası elde edilmiştir. Bu PCR ürünüde NcoI RE'nin bir tanıma bölgesi vardır. NcoI RE ile muamele edildiğinde homozigot GG doğal tip genotipinde PCR ürünü bir bölgeden kesilerek 87+20 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edilmiştir. TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizminde G nükleotidinin yerini A nükleotidinin alması sonucunda NcoI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ortadan kalkmıştır. Bundan dolayı, AA polimorfik allel için 107 bç uzunlukluğunda tek bir DNA parçası elde edilmiştir. Heterozigot GA genotipi için ise 107+87+20 bç uzunluklarında DNA parçaları elde edilmiştir (şekil 5.1 ve şekil 5.2).



Şekil 5.2 IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) ve TNF- $\alpha$  -308G>A gen polimorfizmlerinin PCR ve RFLP ürünleri denatüre olmayan poliakrilamid jel üzerinde gösterimi.

1-4: IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) gen polimorfizmi [1-PCR ürünü (199 bç), 2-homozigot doğal tip TT alleli (129+70 bç), 3-heterozigot TA alleli (129+70+56+14 bç), 4-homozigot polimorfik AA alleli (129+56+14 bç)]; 5-8: TNF- $\alpha$  -308G>A gen polimorfizmi [5-PCR ürünü (107 bç), 6-homozigot doğal tip GG alleli (87+20), 7-heterozigot GA alleli (107+87+20), 8-homozigot polimorfik AA alleli (107 bç)]; M<sub>1</sub>: Marker (pUC19), M<sub>2</sub>: Marker (100bç DNA leader).

### 5.3. Genotip dağılımlarının istatistiksel değerlendirilmesi ve risk oranlarının belirlenmesi

#### 5.3.1. IFN- $\alpha$ 5 -2529 T>A polimorfizmi için;

IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A polimorfizmi açısından değerlendirilen hasta grubunda TT, TA ve AA genotiplerinin sıklıkları  $\chi^2$  testi ile hesaplanmış ve sırasıyla; 0.76, 23 ve 0.07 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uyum gösterdiği tespit edilmiştir ( $\chi^2=0.93$ ,  $p=0.33$ ). Kontrol grubunda bu genotiplerinin sıklıkları ise sırasıyla; 0.72, 0.23 ve 0.03'dür. Bu değerler de Hardy-Weinberg eşitliği ile uyum göstermektedir ( $\chi^2=1.43$ ,  $p=0.23$ ).

Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri tablo 5.3.'de verilmiştir. IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A polimorfizmi TT, TA ve AA genotiplerinin dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ( $\chi^2=3.08$ ,  $p=0.21$ ). TT+TA ve AA genotiplerinin dağılımı açısından da gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (Fisher's Exact testi,  $p=0.12$ ).

Yaşayan ve ölen hasta grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri tablo 5.4.'de verilmiştir. Bu polimorfizm için yaşayan ve ölen hasta gruplarında yer alan genotiplerin frekanslarının Hardy-Weinberg eşitliğine uyum gösterip göstermediği değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların bu eşitlik ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (sırasıyla  $\chi^2=0.60$ ,  $p=0.43$  ve  $\chi^2=0.43$ ,  $p=0.50$ ).

Yaşayan ve ölen hastaların TT, TA, AA genotip frekansları sırasıyla: 0.76, 0.22 ve 0.08; 0.73, 0.26 ve 0'dır. Ölen hastalar arasında AA genotipi tespit edilememiştir. Bu gruptaki hastalar IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A polimorfizmi TT, TA ve AA genotiplerinin dağılımı açısından karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür ( $\chi^2=0.24$ ,  $p=0.88$ ). Ayrıca bu iki grup arasında TT+TA ve AA genotiplerinin dağılımı açısından da anlamlı bir fark yoktur (Fisher's Exact testi,  $p=1.00$ ).

IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A polimorfizmi genotip dağılımı ile ilgili yapılan değerlendirme sonucunda ağır ve hafif olgulara ait genotip dağılımının Hardy Weinberg eşitliği'ne uyumlu olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla  $\chi^2=1.05$ ,  $p=0.30$  ve  $\chi^2=0.25$ ,  $p=0.61$ ). Ağır ve hafif olgularda TT, TA ve AA genotip sıklıkları tablo 5.5'de verilmiştir. TT, TA, AA ve TT+TA, AA genotiplerinin dağılımı açısından ağır ve hafif olgular karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (sırasıyla  $\chi^2=1.384$ ,  $p=0.50$  ve Fisher's Exact testi,  $p=1,00$ ).

T ve A allel sıklıkları hem hasta-kontrol hem yaşayan-ölen hasta grupları hem de ağır-hafif olgular arasında karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (Fisher exact testi,  $p>0,05$ ).

Hasta-kontrol, yaşayan-ölen hasta grupları ve ağır-hafif olgular arasında genotip ve allel dağılımlarının karşılaştırılması sonucunda %95 güvenlik aralığında elde edilen OR (odds ratio) değerleri tablo 5.3, 5.4 ve 5.5'de verilmiştir. Bu veriler doğrultusunda ikili gruplar arasında anlamlı bir OR değerinin bulunmadığı tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ). Ayrıca ölen hastalar ve ağır olgular arasında homozigot AA genotipini taşıyan bireyler tespit edilemediğinden bu genotipin diğer genotiplere oranla taşıdığı risk oranı (OR değeri) belirlenememiştir.

### **5.3.2. IFN- $\alpha$ 10 Cys20>stop (T>A) polimorfizmi için;**

Kontrol grubunda yer alan homozigot allel 1 (TT) doğal tip, heterozigot (TA) ve homozigot allel 2 (AA) polimorfik genotiplerinin frekansları sırasıyla 0.65, 0.28 ve

0.05; hasta grubunda 0.64, 0.32 ve 0.03 şeklindedir. Yaşayan ve ölen hastalarda 0.66, 0.29, 0.03 ve 0.47, 0.52, 0; ağır ve hafif olgularda sırasıyla 0.63, 0.36, 0 ve 0.64, 0.31, 0.04 şeklindedir. Ölen hastalar ve ağır olgular arasında AA genotipi tespit edilememiştir. Hasta- kontrol grubunda, ölen-yaşayan hastalar ve ağır-hafif olgular arasında bu polimorfizmde gözlenen genotip frekansları karşılaştırıldığında grupların Hardy-Weinberg Eşitliğine uyumlu olduğu belirlenmiştir.  $\chi^2$  ve p değerleri sırasıyla şöyledir: hasta grubunda  $\chi^2=0.17$ , p=0.67, kontrol grubunda  $\chi^2=1.35$ , p=0.24; ölen hastalarda  $\chi^2=2.42$ , p=0.11), yaşayan hastalarda  $\chi^2=0.05$ , p=0.81; ağır olgularda  $\chi^2=1.62$ , p=0.20, hafif olgularda  $\chi^2=0.02$ , p=0.87.

Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri tablo 5.3.'de verilmiştir. IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) polimorfizmi genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı (p>0.05) tespit edilmiştir ( $\chi^2=1.12$ , p=0.56).

Allel dağılımı açısından da bu iki grup karşılaştırıldığında elde edilen veriler doğrultusunda hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (Fisher'Exact testi, p=1.00).

Ağır ve hafif olgular IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) polimorfizmi TT, TA ve AA genotip dağılımı açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ( $\chi^2=1.58$ , p=0.45). Her iki olgu allel dağılımı açısından da karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Fisher's Exact testi, p= 0.86).

Hasta-kontrol (tablo 5.3) ve ağır-hafif olgu grupları (tablo 5.4) arasında genotip ve allel dağılımı karşılaştırıldığında anlamlı bir risk oranı tespit edilmemiştir (Fisher's Exact testi, p>0.05).

Yaşayan ve ölen hasta grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri tablo 5.4.'de verilmiştir. Yaşayan ve ölen hastalar bu polimorfizmde görülen homozigot allel 1 (TT) doğal tip, heterozigot (TA), homozigot allel 2 polimorfik genotip (AA) dağılımları açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ( $\chi^2=4.32$ , p=0.11). Ayrıca bu gruplar allel dağılımı açısından karşılaştırıldığında da yaşayan ve ölen hastalar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Fisher's Exact testi, p=0.27).

OR değerleri karşılaştırıldığında heterozigot genotipi taşıyan bireylerin homozigot allel 1 (TT) doğal genotipi taşıyan bireylere oranla 2.4 kat daha fazla riske

sahip oldukları tespit edilmiştir, fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Yine A allelini taşıyan bireylerin T allelini taşıyan bireylere oranla 1.6 kat daha fazla riske sahip oldukları, buna karşın bu oranın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Fisher's Exact testi,  $p=0.27$ ).

Ölen hastalar ve ağır olgularda homozigot allel 2 polimorfik genotipi tespit edilememiştir. Buna bağlı olarak, diğer genotiplerle karşılaştırıldığında bu genotipin öngörülen risk oranı belirlenememiştir.

### **5.3.3. TNF- $\alpha$ -308G>A polimorfizmi için;**

TNF- $\alpha$  -308G>A polimorfizmi açısından değerlendirilen hasta grubunda GG, GA, AA ve GG+GA genotiplerinin frekansları sırasıyla; 0.81, 0.16, 0.02 ve 0.18 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen değerler Hardy-Weinberg eşitliğine uyum göstermektedir ( $\chi^2=1.51$ ,  $p=0.21$ ). Kontrol grubunda bu genotiplerin frekansları ise sırasıyla; 0.81, 0.17, 0.06 ve 0.18'dir. Bu değerler de Hardy-Weinberg eşitliği ile uyum göstermektedir ( $\chi^2=0.21$ ,  $p=0.64$ ).

Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri tablo 5.3.'de verilmiştir. TNF- $\alpha$  -308G>A polimorfizmi genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ( $\chi^2=1.31$ ,  $p=0.51$ ).

Ayrıca hasta ve kontrol grupları arasında homozigot AA genotipini taşıyan bireylerin homozigot GG doğal tip genotipini taşıyan bireylere oranla yaklaşık olarak 3,4 kat daha fazla riske sahip oldukları tespit edilmiş fakat p değeri dikkate alındığında bu değer istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir (Fisher's Exact testi,  $p=0.34$ ).

Allel frekans dağılımı hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Bu polimorfizm için, yaşayan ve ölen hasta gruplarının genotip frekanslarının Hardy-Weinberg eşitliğine uyum gösterip göstermediği değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların bu eşitlik ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (sırasıyla  $\chi^2=3.34$ ,  $p=0.06$  ve  $\chi^2=0.66$ ,  $p=0.41$ ). Yaşayan ve ölen hastaların GG, GA, AA, GG+GA genotip sıklıkları sırasıyla: 0.83, 0.14, 0.02 ve 0,16; 0.68, 0.31, 0 ve 0.31'dir. Ölen hastalar arasında AA genotipi tespit edilememiştir.

Yaşayan ve ölen hasta grubuna ait genotip, allel frekansları ve OR değerleri tablo 5.4.'de verilmiştir. Yaşayan ve ölen hastalar TNF- $\alpha$  -308G>A polimorfizmi genotip dağılımı açısından karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ( $\chi^2=3.78$ ,  $p=0.15$ ).

Yaşayan ve ölen hasta grupları arasında G ve A allelinin frekans dağılımı karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (Fisher's Exact testi,  $p=0.25$ ).

Bu gruplar arasında heterozigot GA ve GA+AA genotiplerini taşıyan bireylerin GG genotipini taşıyan bireylere oranla sırasıyla 2.6 ve 2.3 kat daha fazla riske sahip oldukları tespit edilmiş fakat  $p>0.05$  olduğundan bu değerlerin anlamsız olduğu görülmüştür (Fisher's Exact testi, sırasıyla  $p:0.09$  ve  $0.12$ ). Ölen hastalar arasında AA genotipini taşıyan birey tespit edilemediğinden bu genotipin GG genotipine oranla taşıdığı risk miktarı hesaplanamamıştır.

Bu iki grup arasında A allelini taşıyan bireylerin G allelini taşıyan bireylere oranla yaklaşık olarak 1,8 kat riske sahip oldukları belirlenmiş, buna karşın bu değer anlamlı bir değer taşımadığı tespit edilmiştir (Fisher's Exact testi,  $p=0.25$ )

Ağır ve hafif olgular TNF- $\alpha$  -308G>A polimorfizmi genotip ve allel dağılımı açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (sırasıyla  $\chi^2=1.31$ ,  $p=0.85$  ve Fisher's Exact testi  $p=0.64$ ). Ayrıca bu grupların genotip dağılımları değerlendirildiğinde Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu bulunmuştur (sırasıyla  $\chi^2=0.70$ ,  $p=0.39$  ve  $\chi^2=0.82$ ,  $p=0.36$ ).

Ağır ve hafif olgulara ait genotip, allel frekansları ve OR değerleri tablo 5.5.'de verilmiştir. Bu tablodaki veriler değerlendirildiğinde ağır olgular ile hafif olgular arasında AA genotipininin GG genotipini taşıyanlara oranla 1.8 kat daha fazla riske sahip olduğu fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ( $p>0.05$ ).

Çizelge 5.3 Hasta ve kontrol grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri

<b>Genotip Sıklıkları</b>	<b>Kontrol Grubu</b>		<b>Hasta Grubu</b>		<b>P Değeri</b>	<b>OR (%95 CI)</b>
	<b>(N)</b>	<b>(%)</b>	<b>(N)</b>	<b>(%)</b>		
<b>IFN-<math>\alpha</math> 5 -2529 T&gt;A</b>						
TT	124	72,9	114	76,0		1
TA	40	23,5	35	23,3	0,89	0,95 (0,56-1,60)
AA	6	3,50	1	0,70	0,12	0,18 (0,02-1,52)
TT + TA	164	96,5	149	99,3		1
<b>Allel Sıklıkları</b>						
T	288	84,7	263	87,7		1
A	52	15,3	37	12,3	0,30	0,77 (0,49-1,22)
<b>IFN-<math>\alpha</math> 10 Cys20&gt;stop (T&gt;A)</b>						
Allel 1	112	65,9	96	64,0		1
Heterozigot	49	28,8	49	32,7	0,54	1,16 (0,72-1,88)
Allel 2	9	5,30	5	3,30	0,58	0,64 (0,21-2,00)
<b>Allel Sıklıkları</b>						
Allel 1 (T)	273	80,3	241	80,3		1
Allel 2 (A)	67	19,7	59	19,7	1	0,99 (0,67-1,47)
<b>TNF-<math>\alpha</math> -308G&gt;A</b>						
GG	139	81,8	122	81,3		1
GA	30	17,6	25	16,7	0,88	0,94 (0,53-1,70)
AA	1	0,60	3	2,00	0,34	3,41 (0,35-33,2)
GG	139	53,1	122	46,9		1
GA+AA	31	18,2	28	18,7	1	1,02 (0,58-1,81)
<b>Allel Sıklıkları</b>						
G	308	90,6	269	89,7		1
A	32	9,40	31	10,3	0,79	1,10 (0,65-1,86)

Çizelge 5.4 Yaşayan ve ölen hasta grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri

Genotip Sıklıkları	Yaşayan Hastalar (N)	Yaşayan Hastalar (%)	Ölen Hastalar (N)	Ölen Hastalar (%)	P Değeri	OR (%95 CI)
<b>IFN-<math>\alpha</math> 5 -2529 T&gt;A</b>						
TT	100	76,3	14	73,3		1
TA	30	22,9	5	26,3	0,77	1,19 (0,39-3,57)
AA	1	0,80	0	0		
TT + TA	130	99,2	19	100		
<b>Allel Sıklıkları</b>						
T	230	87,8	33	86,8		1
A	32	12,2	5	13,2	0,79	1,08 (0,39-2,99)
<b>IFN-<math>\alpha</math> 10 Cys20&gt;stop (T&gt;A)</b>						
Allel 1	87	66,4	9	47,4		1
Heterozigot	39	29,8	10	52,6	0,07	2,47 (0,93-6,58)
Allel 2	5	3,80	0	0		
<b>Allel Sıklıkları</b>						
Allel 1 (T)	213	81,3	28	73,7		1
Allel 2 (A)	49	18,7	10	26,3	0,27	1,55 (0,70-3,40)
<b>TNF-<math>\alpha</math> -308G&gt;A</b>						
GG	109	83,2	13	68,4		1
GA	19	14,5	6	31,6	0,09	2,64 (0,89-7,82)
AA	3	2,3	0	0		
GA+AA	22	16,8	6	31,6	0,12	2,28 (0,78-6,66)
<b>Allel Sıklıkları</b>						
G	237	90,5	32	84,2		1
A	25	9,5	6	15,8	0,25	1,77 (0,67-4,66)



Çizelge 5.5 Ağır ve hafif olgu grubuna ait genotip, allel sıklıkları ve OR değerleri

Genotip Sıklıkları	Ağır Olgular		Hafif Olgular		P Değeri	OR (%95 CI)
	(N)	(%)	(N)	(%)		
<b>IFN-<math>\alpha</math> 5 -2529 T&gt;A</b>						
TT	23	69,7	91	71,8		1
TA	10	30,3	25	21,4	0,001	0,12 (0,05-0,28)
AA	0	0	1	0,90		
TT + TA	33	100	116	99,1		
<b>Allel Sıklıkları</b>						
T	56	84,8	207	88,5		1
A	10	15,2	27	11,5	0,40	1,36 (0,62-2,99)
<b>IFN-<math>\alpha</math> 10 Cys20&gt;stop (T&gt;A)</b>						
Allel 1	21	63,6	75	64,1		1
Heterozigot	12	36,4	37	31,6	0,83	1,16 (0,51-2,60)
Allel 2	0	0	5	4,30		
<b>Allel Sıklıkları</b>						
Allel 1 (T)	54	81,8	187	79,9		1
Allel 2 (A)	12	18,2	47	20,1	0,86	0,88 (0,43-1,78)
<b>TNF-<math>\alpha</math> -308G&gt;A</b>						
GG	26	78,8	96	82,1		1
GA	6	18,2	19	16,2	0,79	1,16 (0,42-3,21)
AA	1	3,00	2	1,70	0,52	1,84 (0,16-21,1)
GA+AA	7	21,2	21	17,9	0,62	1,23 (0,47-3,21)
<b>Allel Sıklıkları</b>						
G	58	87,9	211	90,2		1
A	8	12,1	23	9,80	0,64	1,26 (0,53-2,97)

## 6. TARTIŞMA

Viral kanamalı ateşlerin (VKA) ortak noktası, hastalığa neden olan etiyolojik ajanın konağın bağışık yanıtını engellenmesidir. Bunu, konakta antiviral yanıtı başlatan hücreleri hedefleyip kendi amacı doğrultusunda kullanarak yapmaktadır. VHF virüslerinin hedeflediği hücrelerde yaptığı değişiklikler, viral yükün karşı konulmaz bir orana ulaşmasına, konakta bağışıklık yanıtın ve endotelin fonksiyonel bozukluklarına yol açmaktadır (8).

KKKA hastalığı, %13-50 arasında ölüm oranına sahip akut viral kanamalı bir hastalıktır (34). Bu güne kadar KKKA patogenezinin esas mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. KKKA patogenezinde in vivo ve in vitro bağışık yanıtın rolü hakkında şu ana kadar elde edilen bilgiler çok azdır. Virüs izolasyonu için oldukça faydalı olan yeni doğmuş fare modelinin dışında elde edilebilir bir hayvan modelinin olmaması varolan bilgilerin çoğaltılmasını engellemektedir (65). Buna karşın yapılan araştırmalar sonucunda Ebola kanamalı ateşi (EHF) ile KKKA arasındaki yakın benzerliklerden yola çıkarak KKKA patogenezinin, konağın antiviral yanıtının yetersiz olmasına ve/veya gecikmesine bağlı olarak viral yük miktarının artması, konak bağışık yanıtın dolaylı etkilerinin (sitokinlerin aşırı yapımının-sitokin fırtınası) enfekte dokularda hasara neden olmasının bir sonucu olabileceği ileri sürülmektedir (1, 8, 16, 38).

Kliniği şiddetli olan veya ölümcül seyreden KKKA hastalarında normal popülasyona göre IFN- $\alpha$  ve TNF- $\alpha$  polimorfizmlerinin hastalığa yatkınlık oluşturmasında ve/veya hastalık seyrinin değişmesinde ve hastalık seyrinin ölüm ile sonuçlanmasında bir bağlantısının olup olmadığını araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda, ilk olarak, hasta grubunda yer alan bireylerin demografik özellikleri değerlendirilmiş, risk faktörlerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Hastalarımızın yaş ortalaması  $46.26 \pm 18$  (17-82 yaş arası) olmasına karşın ölen hastalarda ( $54.00 \pm 18$ ) yaşayan hastalara ( $45.14 \pm 18$ ) oranla yaş ortalaması daha yüksek bulunmuştur. KKKA'nın herhangi bir yaş gurubuna özgü olmadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (31, 131) fakat ortalama 30-40'lı yaşlardaki bireylerde diğer yaşlara oranla KKKA daha fazla görüldüğü dikkati çekmektedir (34, 132-134). Literatürler, KKKA vakalarının daha çok bu yaşlarda dağılım göstermesinin nedenini kene popülasyonuna maruz kalan ve aktif olarak çalışan kesimin bu yaş gruplarında

olmasından kaynaklandığını bildirmektedir (135). 2009 yılında yapılan bir çalışmada, bizim çalışmamızla uyumlu olarak, ölen hastaların yaş ortalamasının yaşayan hastalara oranla anlamlı olarak daha büyük olduğu bulunmuştur ve ileri yaşın ölüm riskini artırabildiği ileri sürülmüştür (136).

İleri yaşın dışında; Kadanalı ve arkadaşlarının hastaların %58,2'sini kadınların oluşturduğu KKKK hastalarında yaptığı bir çalışmada, çiftçilik, hayvancılık, kırsal alanda yaşama ve kene ısırığı öyküsünün risk faktörü oluşturduğu belirlenmiştir (144). Rapor edilmiş KKKK vakaları arasında erkek kadın oranı hayvanlar ile teması gerektiren mesleklerdeki cinsiyet dağılımını yansıtmaktadır (28). Ayrıca ülkeler arasında, kadınların tarımsal çalışmalara katılma oranına bağlı olarak kadın ve erkek oranı farklılık gösterebilir (39). Türkiye'de bu oran hemen hemen eşittir. Ülkemizde kadınlar çiftçilik ve hayvancılıkla erkeklere destek verdiklerinden kene ve çiftlik hayvanlarına sıklıkla maruz kalmaktadırlar. Ülkemizde 2003 yılındaki salgında olguların % 90'ı çiftçi olduğu; 2004-2007 yılları arasında meydana gelen salgınlardan değerlendirmeye alınan hastaların %36.4 hasta evhanımı, %34.1 hastanın ise çiftçidir olduğu bulunmuştur (49, 51, 65, 138). Tüm bu ifadelerle uyumlu olarak, çalışmamızda yer alan hasta grubunun %56'sını kadınların %43'ünün erkeklerin oluşturduğu; ayrıca kadınların hepsinin evhanımı, erkekler ise çiftçilik ve hayvancılıkla uğraştıkları görülmüştür.

Türkiye'de 2003 yılındaki salgında hastaların % 60'ında (51, 65, 138), 2004-2007 yılları arasındaki salgınlarda ise hastaların %68.9'unda kene ısırığı veya kene teması, %61,7'sinde yakın hayvan teması olduğu ve bu hastaların %90.3'ü kırsal kesimde yaşadığı tespit edilmiştir (49). Bunun dışında, Sivas ve Tokat bölgesinde tespit edilen KKKK hastaları arasında yapılan bir çalışmada, Türkiye'de KKKK hastalarının %40-60'ı arasında kene ısırığı öyküsü rapor edilmiştir ve toplam kene ısırığı sıklığı %62 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada, KKKAV'nün seroprevalansının kırsal kesimde yaşayan bireylerde kentte yaşayan bireylere oranla daha yüksek olduğuda belirtilmiştir (140,141). Oysa İran'da hayvan ticaretinin yapıldığı marketlerin büyük kentlerin varoşlarında bulunmasından dolayı bu ülkede kırsal kesimde yaşayanlara oranla kentte yaşayan insanlarda KKKAV'nin serumdaki varlığının (seroprevalansının) daha yüksek olduğu bulunmuştur (139). Türkiye'de ve yöremizde yapılan çalışmalarda elde edilen verilerle benzer olarak çalışma grubumuzdaki hastaların tamamına yakını

(%98) kırsal kesimde yaşamaktadır. 142 hastanın (%94.6) kene ile temas öyküsü varken 8 hastada kene öyküsü bulunmamaktadır. Bu 8 hasta kırsal bölgede yaşamakta, çiftçilik ve hayvancılıkla uğraşmaktadırlar. Kene temas öyküsü olmadığı halde KKKA hastası olmasını açıklar nitelikte bir çalışma 2009 yılında Kaya Kılıç ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar Ankara’da kene öyküsü olmayan, endemik bölgeden gelmeyen ve enfekte ürünlerle teması bulunmayan iki hasta tespit etmişlerdir. Bu hastalardan birinin çiftlik hayvanlarıyla temas ettiği diğerinin de çiftçilik yaptığı belirlenmiştir (142).

KKKA tanılı hastalarda başlıca laboratuvar bulguları arasında trombositopeni, lökopeni ve artmış transaminaz (AST ve ALT) seviyeleri yer almaktadır. Bu bulgular hastalığın patogenezi ve prognozu ile birebir ilişkilidir. Türkiye’de KKKA hastalarında trombositopeni (%93,2) en yaygın laboratuvar bulgusudur, bunu lökopeni (%88,9) (akut dönemde lökositoz görülmektedir) ve artmış transaminaz (AST ve ALT) seviyeleri (%85,9) izlemektedir (49).

Ergönül ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada değerlendirdikleri tüm KKKA hastalarında, trombositopeni ve AST, ALT, laktik dehidrogenaz (LDH) ve kreatinin fosfokinaz (CPK) seviyelerinin arttığını tespit etmişlerdir. 35 hastanın 30’unu (%86) ağır olgu olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada AST/ALT seviyelerinin hafif olgulara oranla ağır olgularda daha yüksek olduğu ve bu verilerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. LDH ve CPK seviyelerinin de ağır olgularda daha yüksek olduğu belirlenmiş fakat bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (138). Ayrıca Swanepoel ve arkadaşları (58) tarafından lökositoz ölümcül sonuçla ilgili bir kriter olarak değerlendirilmesine karşın başka bir araştırmada sadece bir ölen, 9 yaşayan hastada lökositoz görülmüştür. 35 hastada elde edilen patolojik laboratuvar bulgularının ortalamaları; trombosit seviyesi/mm<sup>3</sup>: 26,000 (3500–108,000), lökosit sayısı/mm<sup>3</sup>: 1740 (150–4000), AST (U/L): 1050 (65–7150), ALT (U/L): 383 (79–1385), aPTT (s): 45 (25–74) olarak tespit edilmiştir (138). Bizde Swanepoel ve arkadaşlarının ağır olgu tanımlama kriterlerine göre tanımladığımız ağır olgularda (n=33) hafif olgulara (n=117) oranla lökosit, AST, ALT değerlerinin çok daha yüksek (hemen hemen iki kat); trombosit değerinin de çok daha düşük olduğunu bulduk. Ayrıca aPTT süresi diğer hastalara oranla ağır olgularda çok uzamıştır. Tüm bu değerler istatistiksel açıdan oldukça anlamlı bulunmuştur (tablo 5.2). Bu değerler Ergönül ve arkadaşlarının

yaptığı çalışmada elde edilen değerlerle uyumludur. Ayrıca, yapılan değerlendirme sonucunda, çalışmamızda ölen hastalarda lökosit seviyesi yaşayan hastalara oranla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Yine Taşdelen-Fışkın, Tanyel (136), Çevik ve arkadaşlarının (45) ölümcül risk faktörlerinin araştırılması amaçlı yaptıkları çalışmalarda, ortalama trombosit sayısının yaşayan hastalara oranla ölen hastalarda anlamlı olarak daha düşük olduğunu bulunmuştur. Ayrıca ölen hastalarda AST ve ALT, LDH ve CPK seviyelerinin çok daha yüksek; PT ve aPTT sürelerinin uzamış olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmalarda, düşük trombosit sayısı, artmış AST, ALT, CPK ve LDH seviyeleri ve uzamış PT, aPTT, INR sürelerinin, ilerlemiş yaşın ve sağlık kuruluşlarına geç başvuru yapılmasının kötü KKKA seyrinin erken belirteçleri olabileceğini ileri sürülmektedir. (45, 136). Bu çalışmadaki verilerle uyumlu olarak, bizim çalışmamızda, ölen hastalarda AST, ALT değerleri yaşayanlara oranla oldukça yüksek, trombosit miktarı oldukça düşük bulunmuştur. aPTT süresi ölen hastalarda ortalama 45,4 s (10-151), fibrinojen 206 µg/dl (89-299), INR 1,2 s (0,8-2,4) olarak tespit edilmiştir.

Yine Yılmaz ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir başka çalışmada da (143) bizim elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Bu çalışmada çok değişkenli bir analiz yapmak için, ağır hastalarda spesifik laboratuvar parametrelerinin en uygun tanılayıcı eşik değerleri kullanılmış (trombosit: 90,000, hemoglobin: 13.5 g/dL, PT: 13.1 s, aPTT: 34 s, INR: 1, AST: 117 U/L, ALT: 71 U/L, AST/ALT: 1.62, LDH: 508 U/L, CK: 267 U/L ve CRP: 0.59 mg/dL) ve bu bulguların hastalık prognozunun kötüleşme riskini ne oranda artırdıkları belirlenmiştir. KKKA'nın ağır olgularında trombosit ve hemoglobinin yukarıda belirtilen eşit değerine sahip olması risk oranını, sırasıyla, 2.59 ve 3.93 kat artırırken, yukarıda belirtilen INR, AST ve CPK eşit değerlerine sahip olmasının, sırasıyla, 2.95, 2.92 ve 3.47 kat artırdığı tespit edilmiştir (143).

Yapılan bazı çalışmalarda KKKA vakalarında ölüm olayının; yüksek viral yük (44, 50, 116), ağır olgularda uyku hali, melena, hematemez, trombositopeni ve uzamış aPTT zamanı, DIC (16, 58), kafaiçi kanama, ciddi karaciğer nekrozu ve geri-dönüşümsüz şok ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (45, 65). Mardani ve arkadaşları, Çevik ve arkadaşları ölen hastalarda, kanama bulgu sıklığını sırasıyla, %85 ve %81.8 olarak tespit etmişlerdir (1, 45). Özellikle, mide-barsak ve sinir sisteminde

meydana gelen kanamaların hastalığın kötü prognozu ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (51).

Yine Hatipoğlu ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir başka çalışmada, yukarıda belirtilen laboratuvar bulgularına ek olarak kanama ve bilinç kaybı oranlarının ölen hastalarda daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada; ishal, melena, hematemaz, hematüri, yüksek AST ve LDH düzeyleri, uzamış aPTT olan hastaların yüksek ölüm riskine sahip olabilecekleri ileri sürülmüştür (144). Bu sonuçlara benzer olarak (1, 45, 144) bizim çalışmamızdaki hastaların %39'unda, ağır olguların %57'sinde ölen hastaların %68,4'ünde kanama bulgusu (ekimoz, peteşi, melena vb.) tespit edilmiştir. Elde edilen bu yüzdeler patolojik laboratuvar değerleri ile (trombosit, aPTT, INR, fibrinojen) anlamlı olarak bağlantılıdır. Ayrıca bizim elde ettiğimiz sonuçlar, Bakır ve arkadaşları (65), Öngörü ve arkadaşlarının (55) KKKK hastalarında pıhtılaşma bozukluğu parametreleri ile ölüm oranı arasındaki ilişkisinin araştırıldığı çalışmada elde edilen sonuçlarla da örtüşmektedir.

Kötü prognoz ile ilişkili diğer bir bulgu olan hepatosplenomegali, yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak 1 ila 3 KKKK hastasında tespit edilmiştir (28, 65). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda hepatosplenomegali sadece 1 hastada tespit edilmiştir.

KKKK klinik seyri bireyler arasında hafif seyirli den ağır seyirliye hatta ölümle sonuçlanmaya kadar farklılık göstermektedir. VHF'larda birçok faktör hastalık seyrini etkilemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, farklı Dengue Virus serotiplerinin ve genotiplerinin hastalığın şiddetini etkilediği tespit edilmiştir (145). Türkiye'de sekiz farklı coğrafik alandan hastalarla yapılan bir çalışma virüs suşlarının benzer gruplar olduğu gösterilmiştir. Aynı virüs suşlarının hastalarda nasıl asemptomatikten ölümcüle kadar farklı klinik seyre neden olduğu henüz açıklanmamıştır (140, 146, 147). Çevik ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada hastalık süresince, biyolojik parametrelerin, hastalığın şiddetinin tahmin edilmesine yardımcı olabileceğini öne sürmüşlerdir (45, 148).

Engin ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada, KKKAV enfeksiyonunun ağır vakalarda ölümcül olabileceğini, bu enfeksiyonun klinik seyir ve sonucunun insanlarda farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, KKKAV enfeksiyonunda, hastalığın şiddetindeki farklılıklara TLR'leri (Tool Like Reseptörleri)

gibi konakçı genomunda meydana gelen mutasyonların neden olabileceğini öngörmüşlerdir. TLR'ler özellikle Tip I interferonları uyararak virüslere karşı konak savunmasında hayati rol oynamaktadır. Çalışmanın sonunda elde veriler doğrultusunda, TLR8 Met1Val, TLR8 -129C/G, and TLR9 -1486T/C polimorfizmlerinin, IFN yapımını etkileyebilmesi nedeniyle, KKKAV enfeksiyonunun klinik seyri üzerine önemli etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür (146).

Ayrıca, Berezky ve arkadaşları 2010 yılında küçük bir hayvan modeli kullanarak tip I interferon reseptörü (IFNAR) hatalı olan (IFNAR<sup>-/-</sup>) genç farelerin KKKAV'ne karşı duyarlı olduğunu ve bu farelerde enfeksiyon sonrası ölümle sonuçlanan akut bir hastalık geliştirdiğini göstermişlerdir. Buna karşın doğal tip farelerde (129Sv/Ew) enfeksiyon asemptomatik seyretmiştir. Viral RNA enfekte farelerin incelenen tüm organlarında tespit edilmiştir. Buna rağmen, KKKAV RNA miktarı doğal tip farelere oranla IFNAR<sup>-/-</sup> genotipine sahip farelerde anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, IFNAR<sup>-/-</sup> genotipi taşıyan farelerin karaciğerlerinin anlamlı olarak daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, farelerde virüs yayılımının sınırlandırılması ve karaciğer hasarına karşı koruma için interferonların oldukça önemli olduğunu göstermektedir (149).

Diğer bir çalışmada araştırmacılar IFN sinyal yolağında önemli bir rol oynayan transkripsiyon 1'in aktivator ve transduser (STAT1) proteininin homozigot bozuk (knockout-KO) şekline sahip fareler kullanmışlardır. STAT1 ve STAT2 aktive olduklarında çekirdeğe göç ederek IFN yanıt genlerinin (IFN tip I, II, III) promoter bölgelerine bağlanırlar. Bu nedenle, STAT1 KO farelerde, IFN'un üç tipine yanıtta seçici sinyal kusuru vardır ve tam bir hücreyi IFN yanıt oluşturamazlar (150).

Tüm bu çalışmalar, interferonların KKKAV'ne karşı konağın doğal savunmasında anahtar bir rol oynadığını göstermektedir. Yapılan literatür araştırmasında, KKKAV hastalarında IFN- $\alpha$  ve TNF- $\alpha$  gen polimorfizmlerine ait yapılmış herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Biz çalışmamızda, IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A ve TNF- $\alpha$  -308 G>A gen polimorfizmlerinde olduğu gibi genlerin promoterlerinde meydana gelen polimorfizmlerin bu bölgelere transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkileyebileceği dolayısıyla bu genlerin transkripsiyonunu etkileyebileceği ya da IFN- $\alpha$  10 gen polimorfizminde olduğu gibi prematüre stop kodonunun oluşmasına bağlı

güdükle proteinin doğru katlanmasına ve/veya reseptöre bağlanmasına engel olabileceği düşünülmüştür.

Hepatit B hastalarında yapılan bir çalışmada, Song ve arkadaşları IFN- $\alpha$  2 geninin promoter bölgesinde doğal olarak ortaya çıkan değişikliklerin, özellikle -300 - 300delAACTTT polimorfizminin genin transkripsiyonunu in vitro olarak azalttığını göstermişlerdir. Transkripsiyonel düzeydeki bu azalmanın, hepatit B'ye yatkınlığın olası nedenlerinden biri olan interferon seviyesindeki bireysel farklılıkları açıklayabileceği ileri sürülmektedir (117). Ayrıca başka bir çalışmada IFN- $\alpha$  2 geninin promoter bölgesinde yer alan indel(insersiyon/delesyon) polimorfizminin hepatit C tedavisini etkilemediği, fakat hepatit B ve hepatit C hastalarında polimorfizm sıklığının daha fazla bulunması sebebiyle viral enfeksiyonlarda IFN- $\alpha$  yolağının önemli olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada IFN- $\alpha$  2 indel polimorfizminin sıtma hastalığını etkilemediği, muhtemelen IFN- $\alpha$ 'nın enfeksiyonun başlamasında bir rol oynadığı fakat hastalığın sonraki aşamalarında etkisinin olmadığı gösterilmiştir (119). Bizim çalışmamızda IFN- $\alpha$  5 geninin promoter bölgesinde yer alan -2529 T>A polimorfizmi incelendiğinde genotip dağılımının hasta ve kontrol grubu arasında farklılık göstermediği tespit edilmiştir, dolayısıyla bu polimorfizmin KKKK hastalığına yatkınlık oluşturmadığı düşünülmüştür. Ayrıca, çalışmamızda yer alan ağır olgularda ve ölen hastalar arasında, (ölen hasta sayısının az olmasına da bağlı olarak) AA polimorfik genotipi tespit edilemediğinden bu polimorfizmin hastalığın prognozuna herhangi bir etkisinin olup olmadığı değerlendirilememiştir. Bununla birlikte, bizim çalışmamızın aksine, Tayland'da yapılan bir çalışmada (118) IFN- $\alpha$  1 -1823 A>G ve IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A polimorfizmleri ile otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematoz (SLE) arasında pozitif bir birliktelik olduğu, aynı zamanda, resesif bir modelde, IFN- $\alpha$  5 -2529 AA ve IFN- $\alpha$  1 -1823 GG genotiplerinin, SLE hastalığına yatkınlığın gösterilmesinde genetik bir belirteçler olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Yine Tip I interferon polimorfizmlerinin geniş çaplı tanımlama çalışmasında (2006), araştırmacılar IFN- $\alpha$  1, IFN- $\alpha$  2, IFN- $\alpha$  4, IFN- $\alpha$  8, IFN- $\alpha$  10, IFN- $\alpha$  16, IFN- $\alpha$  21 VE IFNB1 gibi bazı tip interferon genlerindeki polimorfizmlerin astım veya atopik fenotiplere yatkınlığı etkilediği ve muhtemelen diğer genlerle birlikte hastalık seyrini etkileyebileceği ileri sürülmüştür (151). Bizim çalışmamızda da, IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) gen polimorfizminde de prematüre stop kodon oluşturan AA polimorfik genotip



ölen hastalar ve ağır olgular arasında tespit edilemediği için bu genotipin de hastalığın prognozuna herhangi bir etkisinin olup olmadığı değerlendirilememiştir. Buna karşın, heterozigot TA genotipi ağır ve hafif olgular arasında anlamlı bir risk oluşturmazken ölen hastalarda yaşayan hastalara oranla 2.4 kat ( $p=0,07$ ) ve ölen hastalarda A allelinin T allele göre 1,5 kat daha fazla kötü prognoz gelişme riskine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına karşın, IFN- $\alpha$  10 gen polimorfizminin diğer faktörlerle birlikte hastalık prognozunun şiddetlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda ileri sürdüğümüz düşünceden farklı olarak; otoimmün bir hastalık olan pulmoner sarkoidoz (2010) ile yapılan bir çalışmada; TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  10, IFN- $\alpha$  17 ve Cystic fibrosis conductance regulator (CFTR) gen mutasyonlarının hastalığın klinik seyri için potansiyel bir risk belirteci olup olmayacağı incelenmiş ve TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  10, IFN- $\alpha$  17 genleri ile daha önce elde edilen verilerle birlikte bir bağlantı oluşturmadığı buna karşın CFTR geninin hastalığın seyrinde önemli bir faktör olabileceği gösterilmiştir (152). Yine çalışmamızda, IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) polimorfizminde genotip dağılımı hasta-kontrol grubu arasında farklılık göstermediğinden bu polimorfizmin hastalığa yatkınlık oluşturmadığı düşünülmüştür. Farklı MS hasta populasyonlarıyla yapılan bir çalışmada, IFN- $\alpha$  10 AA alleli İsveç populasyonunda %8.7; Alman populasyonunda %15 sıklıkta bulunmasına rağmen bizim çalışmamızdaki bulguya benzer olarak MS hastalığına yatkınlık oluşturmadığı bulunmuştur (96).

KKKA olgularında normal popülasyona göre IFN- $\alpha$  polimorfizmlerinin hastalık seyrinin ölüm ile sonuçlanmasında bir bağlantısı olup olmadığını araştırmak amacıyla çalışma grubumuzla yaptığımız farklı bir proje kapsamında IFN- $\alpha$  17 Ile184Arg (551 T>G) polimorfizmi ile hastalık prognozu arasındaki ilişki ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre KKKA'lı hasta grubunda IFN- $\alpha$  17 Ile/Ile genotipi taşıyan bireylerin sağlıklı kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat daha fazla hastalık riskine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu değer istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Ölen hastalar ve ağır olgular arasında IFN- $\alpha$  17 Arg/Arg genotipinin tespit edilememesinden dolayı hastalığın şiddetine etkisi ve ölüm risk oranı belirlenememiştir. Ölen hastalar arasında büyük olasılıkla hasta sayısının düşük olmasına bağlı olarak Ile/Ile genotipi tespit edilemediği halde IFN- $\alpha$  10 polimorfizminde elde edilen verilerin aksine KKKA'lı hasta grubunda kontrol grubuna

göre önemli bir risk oranının bulunması KKKA hastalığının oluşmasında etkin olabileceğini fakat bu genotipin tek başına hastalığın prognozunda etkin bir rol oynamayacağını düşündürmektedir (153).

2004 yılında, Japonya’da sarkoidoz ve IFN- $\alpha$  genotipi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışma (154), bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin farklı bir açıdan tekrar değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu çalışmada IFN- $\alpha$  genotipi ve IFN- $\alpha$  yapımı arasında nasıl bir ilişki olduğu da incelenmiştir. Çalışma sonucunda; IFN- $\alpha$  10 T alleli ile IFN- $\alpha$  17 T (ile) ve IFN- $\alpha$  10 A ile IFN- $\alpha$  17 G alleli arasında güçlü bir bağlantı dengesizliği (LD=linkage disequilibrium) olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmacılar doğal tip IFN- $\alpha$  10 T- IFN- $\alpha$  17 T allellerini “*allel 1*”, polimorfik IFN- $\alpha$  10 A- IFN- $\alpha$  17 G allellerini de “*allel 2*” olarak adlandırmışlardır. Elde edilen veriler ışığında, IFN- $\alpha$  *allel 2*’nin sarkoidoz hastalığına yatkınlığı anlamlı olarak artırdığı ileri sürülmüştür (154). Buna ek olarak, sistemik lupus eritematoz hastalarında yapılan bir başka çalışmada IFN- $\alpha$  10- IFN- $\alpha$  17 *allel 2*’nin bu hastalığın patogenezi ve sonucu ile bir bağlantısının olmadığı ileri sürülmüştür (155). Ayrıca, nazofaringeal karsinoması olan hastalarda yapılan bir çalışmada da, bu hastalarda kontrol grubuna göre *allel 1*’in anlamlı bir artış yaptığı gösterilmiş ve bu allelin düşük IFN- $\alpha$  yapımından sorumlu olduğu varsayılmıştır (156). Tek tek değerlendirdiğimizde IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) polimorfizminde AA allelinde meydana gelen prematüre stop kodonuna bağlı fonksiyonel olmayan IFN- $\alpha$  allelinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu allelin transkripsiyonel etkisi netlik kazanmamıştır. Oysa IFN- $\alpha$  10 ve IFN- $\alpha$  17 gen polimorfizmleri (LD’ye bağlı olarak) birlikte değerlendirildiğinde KKKA hastalığına yatkınlıkta ve/veya prognozunun değişmesinde düşük IFN yapımından sorumlu IFN- $\alpha$  10 TT- IFN- $\alpha$  17TT yani *allel 1* genotipinin dikkate alınması gerektiği düşünülmektedir. Bu ifadeye göre yaptığımız istatistiksel analiz sonucunda *allel 1* genotipinin KKKA hastalarının kontrol grubuna oranla 5 kat daha fazla riske sahip oldukları tespit edilmiştir fakat bu değer istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır (p=0.07). Elde edilen bu sonuç, IFN- $\alpha$  10 ve IFN- $\alpha$  17 gen polimorfizlerinin hem KKKA hastalığına yatkınlıkta hem de hastalığın prognozunda etkin rol oynayabileceğini ve diğer IFN- $\alpha$  gen polimorfizmleri arasında da böyle bağlantıların olup olmadığının araştırılması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır.

IFN yanıtın yetersizliğine bağlı virüsün konakta yaptığı yıkıma devam etmesi sonucunda prognozun kötüleşebileceği önceki ifadelerde belirtilmiştir. IFN- $\alpha$ 'nın yanı sıra diğer sitokinlerin de hastalığın prognozunda önemli roller oynadığı bildirilmektedir. Bununla bağlantılı olarak, son dönemlerde yapılan çalışmalarda, KKKA'da görülen kapiller permeabilite artışı ve pıhtılaşma fonksiyon bozukluklarının neden olduğu kanamaların, DIC gelişiminin ve çoklu organ yetmezliğinin proinflatuar sitokin yapımı ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüş ve TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyesinin ölen KKKA hastalarında yaşayan hastalara oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (41, 157). Hastalığın patogenezi düşünülürken, önemli bir inflammatuar sitokin olan TNF- $\alpha$ 'nın, hastalık prognozunu kötüleşmesinde ve ölümün görülmesinde etkin rol oynayabileceği öngörülmektedir. KKKA hastalarında TNF- $\alpha$  seviyesinin yüksek olmasının, genin ekspresyonunu etkileyen ve genin promotör bölgesinde meydana gelen polimorfizmlerin neden olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizmine ait genotip dağılımı hasta-kontrol grupları arasında farklılık göstermemektedir. Fakat TNF- $\alpha$  -308 AA genotipinin KKKA hastalarında kontrol grubuna göre 3.4 kat daha fazla riske sahip olduğu bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmasada bu değer AA genotipinin KKKA hastalığının gelişmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, İranda yapılan bir çalışmada İran popülasyonunda yaygın olarak bulunmasına rağmen, TNF- $\alpha$  -308 A allelinin kronik HBV enfeksiyonunun gelişimi ile bir ilişkisinin olmadığı bulunmuştur (158). Loke ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada, Vietnamlı Dengue kanamalı ateş (DHF) hastalarında TNF- $\alpha$  -308 G>A ve TNF- $\alpha$  -238 G>A polimorfizmlerinin hastalıkla bir ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir (159).

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler arasında, ölen hastalarda homozigot polimorfik AA genotipi tespit edilemediğinden, hastalığın prognozuna etkisi belirlenememesine karşın ağır olgularda hafif olgulara oranla homozigot AA genotipinin 1.8 kat risk oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunun dışında, ölen hastalarda yaşayanlara oranla heterozigot GA genotipinin ve GA+AA genotipinin homozigot GG allele karşı ve A allelinin G allele karşı sırasıyla 2.6, 2.2, 1.7 kat risk oluşturduğu belirlenmiştir. Tüm bu değerlerin istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına ve ölen hasta sayısının azlığına bağlı AA polimorfik allelin tespit edilmemesine karşın, bu polimorfizmin genin ekspresyonunu etkileyerek hastalığın şiddetini artırdığı

düşünülmektedir. Bizim düşüncemizle uyumlu olarak Kore’de hepatit B ile TNF- $\alpha$  -308 (rs1800629) G>A polimorfizmi A allelinin varlığı, rs1800630 A varyantının yokluğu gen sentez seviyesini ve hastalığın sonucunu etkilediği belirlenmiştir (158). Yine geniş çaplı bir çalışmada çeşitli enfeksiyon hastalıklarında TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizmi AA genotipinin TNF- $\alpha$  yapımını artırdığı ve enfeksiyonların sonuçları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (160). Ayrıca başka bir çalışmada daha TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizminin bronşial astımın şiddetinde önemli bir rol oynadığı da rapor edilmiştir (161).

Puumala hanta virüsün neden olduğu nefropatia epidemika (NE), orta şiddetli kanamalı ateş enfeksiyonu ile yapılan bir çalışmada TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizminde hastalığın sonucuna etkisi incelenmiş ve öngörümüzü destekler nitelikte homozigot AA polimorfik genotipi taşıyan bireylerde hastalığın daha şiddetli görüldüğü tespit edilmiştir (107). Buna ek olarak, Fernandez-Mestre ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada, TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizminin kanama bulguları olan DHF hastalarında A allelinin kanama oluşma riski ile yüksek oranda bağlantı gösterdiği rapor edilmiştir. Yine bu çalışmada DHF ile TNF- $\alpha$  yüksek (AA) genotipi/IL-10 düşük genotipi arasında bir birliktelik olduğu da bildirilmiştir (162). Dengue enfeksiyonu esnasında ortaya çıkan damar geçirgenliğinin aşırı artmasında bu sitokinin patojenik rolünün olduğunu gösteren diğer bir çalışmada da, genin fazla ekspresse olmasına neden olan TNF- $\alpha$  A alleli ile DHF arasında bir bağlantı olduğu bulunmuştur (163).

Çalışma sonuçlarımız KKKA hastalığının gelişmesinde ve prognozunda IFN- $\alpha$  ve TNF- $\alpha$  gen polimorfizminin önemli olabileceğini göstermektedir. Fakat KKKA patogenezinde immün sisteme ait birçok faktörün önemli rol oynadığı düşünüldüğünde diğer sitokinleri kodlayan genlerde, gen ürünlerinin reseptörlerinde ve bunların yer aldığı sinyal yollarında işlev yapan proteinleri kodlayan genlerde yer alan mutasyon ve polimorfizmlerinde taranmasının KKKA hastalığının prognozunun açıklanmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca hastalığın prognozunun değerlendirilmesinde hasta grubunun genişletilmesinin de bu tür çalışmaları daha anlamlı kılacağı düşünülmektedir.

## 7. SONUÇLAR

1. Çalışmada 150 KKKA kesin tanısı konmuş hasta ile 170 sağlıklı-gönüllü birey (kontrol grubu) değerlendirmeye alınmıştır. 150 KKKA hastasının 33'ü ağır, 117'si hafif olgu olarak belirlenmiştir. Ayrıca hastaların 19'u ölmüş, 131 birey sağlıklı olarak taburcu edilmiştir.

2. Yaş dağılımı açısından hasta-kontrol grubu ve ağır-hafif olgular arasında fark bulunmazken ölen hastaların yaşlarının ( $54.00 \pm 18$ ) yaşayan hastalara ( $45.14 \pm 18$ ) ve kontrol grubuna ( $43.09 \pm 10$ ) oranla daha büyük olduğu tespit edilmiştir.

3. Hasta grubunda yer alan bireylerin %98'i kırsal kesimde yaşamaktadır ve hastaların %94.7'sinde kene ile temas öyküsü mevcuttur. Hasta kadınların hepsinin ev hanımı olduğu, erkeklerin ise çiftçilik ve hayvancılıkla uğraştıkları tespit edilmiştir.

4. Ölen hastalarda yaşayan hastalara oranla ortalama lökosit sayısı daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, trombosit sayısının, INR ve aPTT sürelerinin ve fibrinojen miktarının hem ağır-hafif olgularda hem de ölen-yaşayan hastalar arasında anlamlı olarak farklı olduğu tespit edilmiştir.

5. Tüm KKKA hastaları kanama bulgusu yönünden değerlendirildiğinde 59 (%39.3) hastada kanama (ekimoz, peteşi, melena vb) olduğu, 91 (%60.7) hastada kanama bulgusu olmadığı belirlenmiştir. 33 ağır olgudan 19'unda (%57.6), 19 ölen hastanın 13'ünde (%68.4) kanama bulgusu olduğu tespit edilmiştir.

6. Hasta- kontrol grubunda, ölen-yaşayan hastalar ve ağır-hafif olgular arasında IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A, IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) ve TNF- $\alpha$  -308G>A polimorfizmlerinde gözlenen genotip frekansları karşılaştırıldığında grupların Hardy-Weinberg Eşitliğine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

7. IFN- $\alpha$  5 -2529 T>A polimorfizmi TT, TA ve AA genotiplerinin ve T, A allellerinin dağılımı açısından hasta-kontrol grubu, yaşayan-ölen hastalar ve ağır-hafif olgular arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendiğinden, bu polimorfizmin KKKA hastalığına yatkınlık oluşturmadığı düşünülmüştür.

8. Ayrıca ölen hastalar ve ağır olgular arasında homozigot AA genotipini taşıyan bireyler tespit edilemediğinden bu genotipin diğer genotiplere oranla taşıdığı risk oranı (OR değeri) belirlenememiştir.

9. IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) polimorfizminde TT, Ta, AA genotiplerinin ve T, A allellerinin dağılımı hasta-kontrol grubu, yaşayan-ölen hastalar ve ağır- hafif olgular

arasında farklılık göstermediğinden bu polimorfizmin hastalığa yatkınlık oluşturmadığı düşünülmüştür.

**10.** IFN- $\alpha$  10 Cys20>stop (T>A) gen polimorfizminde de prematüre stop kodon oluşturan AA polimorfik genotip ölen hastalar ve ağır olgular arasında tespit edilemediği için bu genotipin de hastalığın prognozuna herhangi bir etkisinin olup olmadığı değerlendirilememiştir.

**11.** IFN- $\alpha$  10 heterozigot TA genotipi ağır ve hafif olgular arasında anlamlı bir risk oluşturmazken ölen hastalarda yaşayan hastalara oranla 2.4 kat ( $p=0,07$ ) ve ölen hastalarda A allelinin T allele göre 1,5 kat daha fazla kötü prognoz gelişme riskine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına karşın, IFN- $\alpha$  10 gen polimorfizminin diğer faktörlerle birlikte hastalık prognozunun şiddetlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmüştür.

**12.** TNF- $\alpha$  -308 G>A polimorfizmine ait genotip dağılımı hasta-kontrol grupları arasında farklılık göstermemektedir. Fakat TNF- $\alpha$  -308 AA genotipinin KKKA hastalarında kontrol grubuna göre 3.4 kat daha fazla riske sahip olduğu bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmasada bu değer AA genotipinin KKKA hastalığının gelişmesinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

**13.** Ölen hastalarda homozigot polimorfik TNF- $\alpha$  -308 AA genotipi tespit edilememiştir.

**14.** Ağır olgularda hafif olgulara oranla TNF- $\alpha$  -308 homozigot AA genotipinin 1.8 kat risk oluşturduğu tespit edilmiştir. Ölen hastalarda yaşayanlara oranla heterozigot GA genotipinin ve GA+AA genotipinin homozigot GG allele karşı ve A allelinin G allele karşı sırasıyla 2.6, 2.2, 1.7 kat risk oluşturduğu belirlenmiştir. Tüm bu değerlerin istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına karşın, bu polimorfizmin genin ekspresyonunu etkileyerek hastalığın şiddetini artırdığı düşünülmektedir.

**15.** Çalışma sonuçlarımız KKKA hastalığının gelişmesinde ve prognozunda IFN- $\alpha$  ve TNF- $\alpha$  gen polimorfizminin önemli olabileceğini bunun yanısıra diğer sitokinleri kodlayan genlerde, reseptörlerinde ve sinyal yollarında işlev yapan proteinleri kodlayan genlerde yer alan mutasyon ve polimorfizmlerinde taranmasının KKKA hastalığının prognozunu açıklanmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Mardani M, Keshtkar-Jahromi M. (2007) Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Arch Iranian Med.* 10(2):204-214.
2. Yapar M, Aydoğan H, Pahsa A, Beşirbellioğlu BA, Bodur H, Başustaoğlu A, Güney C, Avcı İY, Şener K, Abu Setteh M, Kubar A. (2005) Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time revers transcriptase-pcr. *Jpn Infect Dis.* 58:358-362.
3. Bakır M, Elaldı N. (2006) Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi. *Ankem* 20(2):227-231.
4. Elaldi N, Kaya S, Dokmetas I. (2007) Markedly Elevated Serum Cytokine Levels and High Viral Titers in Fatal Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF). 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, Illinois, USA, Congress Book:482.
5. Weber F, Mirazimi A (2008) Interferon and cytokine responses to Crimean congo hemorrhagic fever virus; an emerging and neglected viral zoonosis. *Cytokine & Growth factor reviews.* 19:395-404.
6. Andersson I, Karlberg H, Mousavi-Jazi M, Martínez-Sobrido L, Weber F, Mirazimi A. (2008) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus delays activation of the innate immune response. *J Med Virol.* 80(8):1397-404.
7. Bray M. (2005) Pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Curr Opin Immunol.* 17:399–403.
8. Saksida A, Duh D, Wraber B, Dedushaj I, Ahmeti S, Acsic-Zupanc T. (2010) Interacting roles of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Cli. Vaccine Immunol* 17(7):1086-1093.
9. Ergönül Ö, Tunçbilek S, Baykan N, Çelikbaş A, Dokuzoğuz B (2006) Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever *J Infect Dis.* 193:941-944.
10. Kim JW, Roh JW, Song YS, Kang SB, Lee HP. (2003) Interferon, alpha 17 (IFNA17) Ile184Arg polymorphism and cervical cancer risk. *Cancer Letter.* 189:183-188
11. Cebeci H, Sökmen M, Ceren N, Adaleti R, Kaspar EÇ, Korachi M. (2010) Kronik Hepatit B hastaları ve asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında interleukin 10 (IL-10) sitokin polimorfizmi. *Viral Hepatit Dergisi.* 15(1): 7-12
12. Golovleva I, Kandefers-Szerszen M, Backman L, Lundgren E (1996) Polymorphism in the interferon- $\alpha$  gene family *Am J Hum Genet* 59:570-578.
13. Kwiatkowski D. (2000) Genetic dissection of the molecular pathogenesis of severe infection. *Inten Care Med.* 26(1):S89-97.
14. Anonymous. (1988) Management of patients with suspected viral hemorrhagic fever. *MMWR.* 37(S-3):1-16.
15. Whitehouse CA. (2004) Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research* 64:145-160.
16. Ergönül Ö. (2006) Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis.* 6:203-214.
17. Gale P, Estrada-Pena A, Martinez M, Ulrich RG, Wilson A, Capelli G, Phipps P, de la Torre A, Munoz MJ, Dottori M, Mioulet V, Fooks AR. (2009) The feasibility of developing a risk assessment for the impact of climate change on the emergence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in livestock in Europe: a review. *J. Applied Microbiol.* 108:1859-1870.

18. Morikawa S, Saijo M, Kurane I. (2007) Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 30:375-389.
19. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. (2004) The high genetic variation of viruses of the genus *Nairovirus* reflects the diversity of their predominant tick hosts. *Virology* 318:10-16.
20. Güneş T. (2006) Kırım-Kongo hemorajik ateş. *Mikrobiyoloji bülteni* 40:279-287.
21. Ahmed AA, McFalls JM, Haffmann C, Filone CK, Shermukhamedova D, Schmaljohn CS, Doms RW, Bertolotti-Ciarlet A. (2005) Presence of broadly reactive ad group-specific neutralizing epitopes on newly described isolates of *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus*. *J Gen Virol.* 88:3327-3336.
22. Papa A, Ma B, Kouidou S, Tang Q, Hang C, Antonidiadis A. (2002) Genetic characterization of the M RNA segment of *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus* strains, China. *Emerg Infect Dis.* 8(1):50-52.
23. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Thomas GK, Nichol ST. (2006) Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genomics and Global Diversity. *J Virol.* 80(17):8834-8842.
24. Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, Feldmann H, Flick R. (2005) Intracellular localization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus glycoproteins. *J Virol.* 2(42):1-14.
25. Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ. (1997) Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med.* 121(8): 839-46.
26. Zavitsanou A, Babatsikou F, Koutis C. (2009) Crimean-Congo hemorrhagic fever: an emerging tick-borne disease *Health Science Journal* 3(1):10-18.
27. Database. [www.Vatansever Z.keneler.pdf](http://www.Vatansever.Z.keneler.pdf)
28. Vorou R, Pierrotsakos IN, Maltezou HC. (2007) Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 20:495-500.
29. Chinikar S, Goya MM, Shirzadi MR, Ghiasi SM, Mirahmadi R, Haeri A, Moradi M, Afzali N, Rahpeyma M, Zeinali M, Meshkat M. (2008) Surveillance and laboratory detection system of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. *Transboundary and Emerg Diseases* 55:200-204.
30. Vorou RM. (2009) Crimean-Congo hemorrhagic fever in southeastern Europe. *International J Infect Dis.* 13:659-662.
31. Yapıcı K, Demir C, Karahocagil MK, Uluç HH, Ceylan A, Akdeniz H. (2010) Kırım-Kongo kanmalı ateşi:12 olgunun değerlendirilmesi. *Van Tıp Dergisi* 17(2):46-49.
32. Elaldı N. (2004) Kırım-Kongo hemorajik ateş epidemiyolojisi. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 26(4):185-190.
33. Capua H. (1998) Crimean-Congo haemorrhagic fever in ostriches: a public health risk for countries of the European Union? *Avian Pathology.* 27:117-120.
34. Gözalan A, Akın L, Rolain J-M, Tapar FŞ, Öncül Ö, Yoshikura H, Zeller H, Raoult D, Esen B. (2004) Tokat ili ve çevresinde saptanan olası bir salgının epidemiyolojik yönden değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji* 38:33-44.
35. Maltezou HC, Andonova L, Bouloy M, Ergönül Ö, Jongejan F, Kalvatchev N, Nichol S, Niedrig M, Platonov A, Thomson G, Leitmeyer K, Zeller H. (2010) Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness. *Euro Surveill.* 15(10):1-4.



36. Yılmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Cevik MA, Torunoğlu MA. (2009) The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *Int J Infect Dis.* 13:380-386.
37. Gözalan A, Esen B, Fitzner J, Tapar FŞ, Özkan AP, Georges-Courbot M-C, Uzun R, Gümüşlü F, Akın L, Zeller H. (2007) Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in Turkey. *Scandinavian J Infect Dis.* 39:332-336.
38. Chinikar S, Ghiasi SM, Hewson R, Moradi M, Haeri A. (2010) Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran and neighboring countries. *J Clin Virol.* 47:110-114.
39. Ergönül Ö. (2009) Kırım-Kongo kanamalı ateşi. *ANKEM* 23(Ek2):234-240.
40. Kubar A, Açikel CH. (2003) Kırım-Kongo kanamalı ateşi. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni* 2(7):121-124.
41. Duru F, Fışkın T. (2009) Kırım-Kongo kanamalı ateşinin hematolojik yönleri. *Türk J Hematol.* 26: 161-166.
42. Mammen EF. Disseminated intravascular coagulation. *Clin Lab. Sci.* 2000;13:239-245.
43. Geisbert TW, Jahrling PB. (2004) Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med.* (Suppl 12):110-21.
44. Duh D, Saksida A, Petrovec M, et al. (2007) Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. *Emerg Infect Dis.* 13(11):1769-772.
45. Çevik MA, Erbay A, Bodur H, Gülderen E, Baştuğ A, Kubar A, Akıncı E. (2008) Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. *Int J Infect Dis.* 12:374-379.
46. Gear JH. (1989) Clinical aspects of African viral hemorrhagic fevers. *Rev Infect Dis.* 11 (Suppl 4):777-82.
47. Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, et al. (2003) Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am J Pathol.* 163:2347-70.
48. Chen JP, Cosgriff TM. (2000) Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 11: 461-483.
49. Ksiazek TG, Rollin PE, Williams AJ, Bressler DS, Martin ML, Swanepoel R, Burt FJ, Leman PA, Khan AS, Rowe AK, Mukunu R, Sanchez A, Peters CJ. (1999) Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgM and IgG antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J Infect Dis.* 179 (Suppl 1): S177-S187.
50. Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, Mahanty S, Sanchez AJ, Wagoner KD, Rollin PE. (2004) Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, viral load, and nitric oxide levels. *J Virol.* 78: 10370-7.
51. Ozkurt Z, Kiki I, Erol S. (2006) Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy. *J Infect.* 52 (3): 207-15.
52. Ardalan MR, Tubbs RS, Chinikar S, Shoja MM. Crimean-Congo hemorrhagic fever presenting as thrombotic microangiopathy and acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2304-7.
53. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic Fever. *Rev Infect Dis* 1989; (Suppl 4): 801-6.

54. Joubert JR, King JB, Rossouw DJ, Cooper R. (1985) A nosocomial outbreak of Crimean- Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part III. Clinical pathology and pathogenesis. *S Afr Med J.* 68 (10): 722-8.
55. Öngörü P, Dağdaş S, Bodur H, Yılmaz M, Akıncı E, Eren S, Özet G. (2010) Coagulopathy parameters in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever and its relation with mortality. *J Clin Lab Analysis* 24:163-166.
56. Karti SS, Odabasi Z, Kortan V, Yılmaz M, Sonmez M, Caylan R, Akdogan E, Eren N, Koksali I, Ovalı E, Erickson BR, Vincent MJ, Nichol ST, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG. (2004) Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis.* 10 (8): 1379-84.
57. Çağatay A, Kapmaz M, Karadeniz A, Başaran S, Yenerel M, Yavuz S, Midilli K, Özsüt H, Eraksoy H, Çalangu S. (2007) Haemophagocytosis in a patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Med Microbiol.* 56:1126-1128.
58. Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, Harvey S. (1989) The clinical pathology of Crimean-Congo Hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 11(Suppl 4): 794-800.
59. Saluzzo J-L, Le Guenno B. (1987) Rapid Diagnosis of Human Crimean-Congo Hemorrhagic Fever and Detection of the Virus in Naturally Infected Ticks. *J Clin Microbiol.* 25(5):922-924.
60. Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Sakai K, Prehaud C, Kurane I, Morikawa S. (2002) Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus*. *J Clin Microbiol.* 40:372–375.
61. Chinikar S, Mazaheri V, Mirahmadi R, Nabeth P, Saron MF, Salehi P, Hosseini N, Bouloy M, Mirazimi A, Lundkvist A, Nilsson M, Mehrabi-Tavana A. (2005) A serological survey in suspected human patients of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran by determination of IgM-specific ELISA method during 2000–2004. *Arch. Iranian Med.* 8(1): 52–55.
62. Saijo M, Qing T, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2005) Recombinant Nucleoprotein-Based Serological Diagnosis of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus Infections. *Journal of Medical Virology* 75:295–299.
63. Ergönül Ö. (2007) *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever A Global Perspective* Springer. ISBN 978-1-4020-6106-6 (e-book) chapter16:207–220.
64. Ergonul O, Celikbas A, Baykam N, Eren S, Dokuzoguz B. (2006) Analysis of risk-factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection: severity criteria revisited. *Clin. Microbiol. Infect.* 12(6):551-554.
65. Bakır M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, Bodur H, Tasyaran MT, Vahaboglu H. And the Turkish CCHF Study Group. (2005) Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in middle anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures. *J Med Microbiol.* 54:1-5.
66. Sonmez M, Aydın K, Durmus A, Sucu N, Yılmaz M, Akdogan E, Koksali I, Ovalı E, Omay SB. (2007) Plasma activity of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect.* 55:379-81.
67. Yılmaz M, Aydın K, Akdoğan E, Sucu N, Sönmez M, Omay SB, Koksali I. (2008) Peripheral blood natural killer cells in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 42:415-417.

68. Akıncı E, Yılmaz M, Bodur H, Ongürü P, Bayazıt FN, Erbay A, Ozet G. (2009) Analysis of lymphocyte subgroups in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Int. J. Infect. Dis.* 13(5):560-3.
69. Barut S, Dincer F, Sahin I, Ozyurt H, Akkus M, Erkorkmaz U. (2010) Increased serum ferritin levels in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever: can it be a new severity criterion? *Int J Infect Dis.* 14:50-54.
70. Onguru P, Akgul EO, Akıncı E, Yaman H, Kurt YG, Erbay A, Bayazıt FN, Bodur H, Erbil K, Acıkel CH, Cevik MA.(2008) High serum levels of neopterin in patients with CrimeaneCongo hemorrhagic fever and its relation with mortality. *J Infect.* 56:366-370.
71. Yılmaz G, Mentеше A, Kaya S, Uzun A, Karahan C, Koksala I. (2011) The diagnostic and prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 50:209–211.
72. Ozturk B, Kuscu F, Tutuncu E, Sencan I, Gurbuz Y, Tuzun H. (2010) Evaluation of the association of serum levels of hyaluronic acid, sICAM-1, sVCAM-1, and VEGF-A with mortality and prognosis in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 47:115–119.
73. Elaldı N, Kaya Ş, Gursoy N, Güneş T, Engin A, Kubar A, Karakuş G, Polat ZA, Yılmaz M, Yılmaz N, Sencan M., Bakır M. Dökmetaş İ. (2007) Efficacy of oral ribavirin treatment on serum viral loads and cytokine levels in severe Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) cases. Poster presentation, 47<sup>th</sup> Interscience Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Minois, USA.
74. Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2003) A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever serologically diagnosed by recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clin and Diagnos Lab Immunol.* 10(3):489-491.
75. Sidwell RW, Smee DF. (2003) Viruses of the Bunya- and Togaviridae families: potential as bioterrorism agents and means of control. *Antiviral Research.* 57:101–111.
76. Bozkurt GY, Memikoğlu KO, Azap A, Balık İ. (2005) Kırım-Kongo kanamalı ateşi: olgu sunumu. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 58:193-196.
77. Akhtar J. (2005) Crimean-Congo haemorrhagic fever: an alert for health care workers. *JCPSP* 15 (12): 751-752.
78. Male D, Cooke A, Owen M, Trowsdale J, Champion B. (1996) Chapter 10 Cytokines and chemokines. *Advanced Immunology* ISBN 0 7234 2059 9:10.1.
79. Kınıklı G, Turgay M. (1997). Ed: G. Tokgöz, Ankara. İmmünolojik tedavi yöntemleri. *Klinik İmmünoloji. Bölüm 27:* 269-288.
80. Trinchieri G. (2001) Cytokines and cytokine receptors. *Immunological reviews.* 202:5-7.
81. Kılıçturgay K. (2000) Sitokinler. In: *İmmünoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul;*175-215.
82. Aydıntuğ O. (1997). Ed: G. Tokgöz, Ankara. Sitokinler. *Klinik İmmünoloji. Bölüm 11:*85-100.
83. Kelso A. (1998). Cytokines: principals and prospects. *Immunol. Cell Biol.* 76:300-317.
84. Elias JA, ZiTniki RJ. (1992). Cytokine-cytokine interactions in the context of cytokine networking. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:365-367.

85. Kaya Ş. (2007) Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalarında ardışık serum sitokin seviyeleri, virüs titreleri ve oral ribavirin tedavisinin etkisi. Uzmanlık tezi. Genel bilgiler:18-19.
86. Güler İ, Özmen D, Bayındır O. (1997) Sitokinler. *T Kin J Med Sci.* 17:65-74.
87. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. (1997). Human chemokines: an update. *Ann. Rev. Immunol.* 15:675-700.
88. Pestka S. (2007) The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biological Chemistry.* 282(28):20047-20051.
89. Samuel EC. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews.* 14(4):778-809.
90. Malmgaard L. (2004) Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res.* 24(8):439-454.
91. Golovleva I, Kandefler-Szeszen M, Beckman L, Lundgren E. (1996) Polymorphism in the interferon- $\alpha$  gene family. *Am J Hum Genet.* 59:570-578.
92. Koyama S, J Ishli K, Coban C, Akira S. (2008) Innate immune response to viral infection. *Cytokine.* doi:10.1016/j.cyto.2008.07.009.
93. Takaoka A, Yanai H. (2006) Interferon signalling network in innate defence. *Cellular Microbiology.* 8(6):907-922.
94. Öngürü P, Özgür AE, Akıncı E. (2008) High serum levels of neopterin in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever and its relation with mortality. *J Infect.* 56: 366-70.
95. Andersson I, Bladh L, Mousavi-Jazi M, Magnusson K-E, Lundkvist A, Haller O, and Mirazimi A. (2004) Human MxA Protein Inhibits the Replication of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J Virol, Apr.* 78(8):4323-4329.
96. Misterski B, Jaekel S, Epplen JT, Pöhlau D, Hardt C and Group MSS. (1999) The interferon gene cluster: a candidate region for MS predisposition? *Genes and Immunity.* 1:37-44.
97. Database. <http://omim.org/entry/191160>.
98. El Naggar EA, Kanda F, Okuda S, Maeda N, Nishimoto K, Ishihara H, Chihara K. (2004) Direct Effects Of Tumour Necrosis Factor Alpha (Tnf-A) On L6 Myotubes. *Kobe J Med Sci.* 50(2):39-46.
99. Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, Pereira D, Moutinho J, Canedo P, Machado JC, Medeiros R. (2005) G-308A TNF- $\alpha$  polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 334: 588–592
100. Horst Ibelgaufts' COPE: Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia. (revision 2011) TNF-alpha.
101. Luster MI, Simeonova P, Gallucci R, Matheson J, Yucesoy B, Sugawara T. (2000) Overview of immunotoxicology and current applications to respiratory diseases. *Immunopharmacology.* 48:311-313.
102. Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel DP, Sharp DS, Matheson J, Burlison F, Luster MI. (2001). Polymorphisms of the IL-1 gene complex in coal miners with silicosis. *Am J Ind Med.* 39:286-291.
103. Database. <http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/student/spring2000/wolf/tnfalpha.html>.
104. Shih C-M, Lee Y-L, Chiou H-L, Chen W, Chang G-C, Chou M-C, Lin L-Y. (2006) Association of TNF- $\alpha$  polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 52:15-20.

105. Papa A, Bino S, Velo E, Harxhi A, Kota M, Antoniadis A. (2006) Cytokine levels in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 36 (4): 272-6.
106. Tasdelen Fisgin N, Fisgin T, Tanyel E, Doganci L, Tulek N, Guler N, Duru F. (2008) Crimean-Congo hemorrhagic fever: Five patients with hemophagocytic syndrome. *Am. J. Hematol.* 83:73–76.
107. Makela S, Hurme M, Ala-Houhala I, Mustonen J, Koivisto A-M, Partanen J, Vapalahti O, Vaheiri A and Pasternack A. (2001) Polymorphism of the cytokine genes in hospitalized patients with *Puumala hantavirus* infection. *Nephrol Dial Transplant* 16:1368-1373.
108. Khan MI, Micheal S, Rana N, Akhtar F, Hollander A I. den, Ahmed A, Qamar R. (2009) Association of tumour necrosis factor alpha gene polymorphism G-308A with pseudoexfoliative glaucoma in the Pakistani Population. *Molecular Vision.* 15:2861-2867.
109. Database: <http://genomebiology.com>. TNF geni üzerindeki polimorfik bölgeler
110. Knight J.C, Udalova I, Hill A.V.S, Greenwood B.M, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. (1999) A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nature Genet.* 22: 145-150.
111. Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. (1995) Renkli Genetik Atlası ISBN: 975-420-035-1.
112. Database. <http://zehirlenme.blogspot.com/2010/10/polimorfizm-nedir.html>
113. Gray IC, Campbell DA and Spurr NK. (2000) Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Human Molecular Genetics.* 9(16):2403-2408.
114. Database. <http://www.ezberim.com/saglik/188095-polimorfizm-nedir-ve-genetik-polimorfizm/>
115. Başbüyük HH, Bardakçı F, Belshaw R. (2000) Quicke DLJ. *Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice.* Önder matbaa, Sivas/Turkey.
116. Klug WS, Cummings MR. (2003) (Çeviri editörü: Öner C.) *Genetik Kavramlar.* Palme Yayıncılık Altıncı baskı, ISBN: 0-13-081626-4, Sayfa: 515-17.
117. Song LH, Nguyen LT, Nguyen TX, Uhlemann AC, Boldt ABW, Duy DN, Binh VQ, Kremsner PG, Kun JFJ. (2006) A promoter polymorphism in the interferon  $\alpha$ -2 gene is associated with the clinical presentation of hepatitis B. *Mutation Research* 601:137-143.
118. Hirankarn N, Tangwattanachuleeporn M, Wongpiyabovorn J, Wongchinsri J, Avihingsanon Y. (2008) Genetic association of interferon-alpha subtypes 1, 2 and 5 in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 72:588-592.
119. Tena-Tomas C, de Messias-Reason I, Song LH, Tomiuk J, Kemsner PG, Kun JFJ. (2008) A globally occurring indel polymorphism in the promoter of the IFNA2 gene is not associated with severity of malaria but with the positivity rate of HCV. *BMC Genetics.* 9(80):1-6.
120. Larrea E, Alberdi A, Castelruiz Y, Boya P, Civeira MP, Prieto J. (2001) Expression of interferon-alpha subtypes in peripheral mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C: a role for interferon-alpha5. *J Viral Hepat* 8:103-110.
121. Castelruiz Y, Larrea E, Boya P, Civeira MP, Prieto J. (1999) Interferon alpha subtypes and levels of type I interferons in the liver and peripheral mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C and controls. *Hepatology.* 29:1900-1904.

122. Fassmann A, Holla L.I, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. (2003) Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308 (A/G) tumour necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontol Res.* 38: 394-399.
123. Kroeger K.M, Carville K.S, Abraham L.J. (1997) The -308 tumour necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription. *Molecular Immunolog.* 34(5): 391-399.
124. Elahi M.M, Asotra K, Matata B.M, Mastana S.S. (2009) Tumour necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1792: 163-172.
125. Seidemann K, Zimmermann M, Book M, Meyer U, Burkhardt B, Welte K, Reiter A, Stanula M. (2005) Tumour necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non-hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Münster trial NHL-BFM 95. *J Clin Oncol.* 23: 33.
126. Demeter J, Porzsolt F, Ramisch S, Schmidt D, Schmid M, Messer G, (1997) Polymorphisms of the tumour-necrosis factor alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol.* 97: 107-112.
127. Wihlborg C, Sjoberg J, Intaglietta M, Axdorph U, Pisa K.E, Pisa P. (1999) Tumour-necrosis factor-alpha cytokine promoter gene polymorphism in Hodgkin's disease and chronic lymphocytic leukaemia,. *Br J Haematol.* 104: 346-349.
128. Bayley P.J, Ottenhoff M.H.T, Verweij L.C. (2004) Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes and Immunity.* 5: 315-329.
129. McGuire W, Hill A.V.S, Allsopp C.E.M, Greenwood B.M, Kwiatkowski D. (1994) Variation in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature.* 371: 508-511.
130. Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. (1996) A genomic polymorphism within the tumour necrosis factor locus influences plasma tumour necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 24:381-384.
131. Ertuğrul B,Uyar Y, Yavaş K, Turan Ç, Öncü S, Saylak Ö, Carhan A, Öztürk B, Erol N, Sakarya S. (2009) An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in western Anatolia, Turkey. *Int J Infect Dis.* 13:431-436.
132. Tasdelen Fısgın N, Dogancı L, Tanyel E And Tulek N. (2010) Initial high rate of misdiagnosis in Crimean Congo haemorrhagic fever patients in an endemic region of Turkey. *Epidemiol. Infect.* 138, 139–144.
133. Alavi-Nainia R, Moghtaderib A, Koochpayeha H-R, Sharifi-Mooda B, Naderia M, Metanata M, Izadia M. (2005) Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeast of Iran. *J Infect.* 7:1–5.
134. Ozkurt Z, Kiki I, Erola S, Erdem F, Yılmaz N, Parlak M, Gundogdu M, Tasyaran MA. (2006) Crimean–Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy. *J Infect.* 52, 207–215.
135. Peyrefitte CN, Perret M, Garcia S, Rodrigue R, Bagnaud A, LacoteS, Crance J-M, Vernet G, Garin D, Bouloy M and Paranhos-Bac G. (2010) Differential activation profiles of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus- and Dugbe virus-infected antigen-presenting cells. *J Gen Virol.* 91:189–198.

136. Tasdelen Fisgin N, Tanyel E. (2009) Risk factors for fatality in patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Tropical Doctor* 39:158–160.
137. Kadanalı A, Erol S, Özkurt Z, Özden K. (2009) Epidemiological risk factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever patients. *Türk J. Med. Sci.* 39(6):829-832.
138. Ergönül Ö, Çelikbaş A, Dokuzoğuz B, Eren Ş, Baykam N, Esener H. (2004) Characteristics of Patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in a Recent Outbreak in Turkey and Impact of Oral Ribavirin Therapy. *Clin Infect Dis.* 39:284–7.
139. Izadi S, Holakouie-Naieni K, Majdzadeh SR, Chinikar S, Nadim A, Rakhshani F. (2006) Seroprevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Sistan-va-Baluchestan province of Iran. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59:326-328.
140. Gunes T, Engin A, Poyraz O, Elaldı N, Kaya S, Dokmetas I, Bakır M, Cınar Z. (2009) *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus* in high-risk population, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 15(3):461-464.
141. Tekin S, Barut S, Bursali A, Aydoğan G, Yuce O, Demir F, Yildirim B. (2010) Seroprevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) in risk groups in Tokat Province of Turkey. *African J Microbiol Res.* 4(3):214-217.
142. Kaya Kiliç E, Yılmaz U, Cesur S, Koçak Tufan Z, Kurtoğlu Y, Bulut C, Kinikli S, Irmak H, Demiröz AP. (2009) Two Crimean-Congo hemorrhagic fever cases without history of tick contact from Ankara region. *Mikrobiyol Bul.* 43(4):677-81.
143. Yılmaz G, Koksall I, Topbas M, Yılmaz H, Aksoy F. (2010) The effectiveness of routine laboratory findings in determining disease severity in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever: Severity prediction criteri. *J Clin Virol.* 47:361–365.
144. Hatipoglu CA, Bulut C, Yetkın MA, Ertem GT, Erdinc FS, Kılıc EK, Sarı T, Kınıklı S, Oral B ve Demiröz AP. (2010) Evaluation of clinical and laboratory predictors of fatality in patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever in a tertiary care hospital in Turkey. *Scandinavian J Infect Dis.* 42:516–521.
145. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, Cecilia D. (2010) Clinical Findings and Pro-Inflammatory Cytokines in Dengue Patients in Western India: A Facility-Based Study. *PloS one.* 5(1):8709.
146. Engin A, Arslan S, Kızıldağ S, Öztürk H, Elaldı N, Dökmetaş I, Bakır M. (2010) Toll-like receptor 8 and 9 Polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Microbes and Infection* 12: 1071-1078
147. Midilli K, Gargili A, Ergönül O, Sengöz G, Öztürk R, Bakar M and Jongejan F. (2007). Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in İstanbul. *BMC Infect. Dis.* 7:54-59.
148. Cevik MA, Erbay A, Bodur H, Eren SS, Akıncı E, Sener K. (2007) Viral load as a predictor of outcome in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clin. Infect. Dis.* 45:96-100.
149. Berezky S, Lindegren G, Karlberg H, Akerström S, Klingström J, Mirazimi A. (2010) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol.* 91(6):1473-1477.
150. Bente DA, Alimonti JB, Shieh W-J, Camus G, Ströher U, Zaki S, Jones SM. (2010) Pathogenesis and Immune Response of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in a STAT-1 Knockout Mouse Model. *J Virol.* 84(21):11089-11100.

151. Chan A, Newman DL, Shon AM, Sneider DH, Kuldane S, Ober C. (2006) Variation in the type I interferon gene cluster on 9p21 influences susceptibility to asthma and atopy. *Genes and Immunity*. 7:169-178.
152. Makrythanasis P, Tzetis M, Rapti A, Papatheodorou A, Tsipi M, Kitsiou S, Tsiamouri A, Poulou M, Roussos C, Kanavakis E. (2010) Cystic fibrosis conductance regulator, tumour necrosis factor, interferon alpha-10, interferon alpha-17, and interferon gamma genotyping as potential risk markers in pulmonary sarcoidosis pathogenesis in Greek patients. *Genet Test Mol Biomarkers*.14(4):577-584.
153. T-427 CÜBAP proje sonuç raporu (2010)
154. Akahoshi M, Ishihara M, Kazuko Uno NR, Miyake K, Kazuko Nakashima TH, Matsuda A, Tadao Enomoto MK, Ohno S, Jean-Laurent Casanova HN, Mayumi Tamari JMH, Mao XQ, Shirakawa T. (2004) Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Hum Genet*. 114: 503-509.
155. Nakashima H, Mitsuteru Akahoshi SM, Yasushi Inoue KM, Tanaka Y, Sakiko Shimizu IN, Igawa T, Takeshi Otsuka AS, Harada M. (2005) Association between IFNA genotype and the risk of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 24:38-40.
156. Golovleva I, Birgander R, Sjalander A, Lundgren E, Beckman L. (1997) Interferon- $\alpha$  and p53 alleles involved in nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis* 18:645–647.
157. Bray M. (2007) Comparative pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever and Ebola hemorrhagic fever. In *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: a Global Perspective*. Sayfa:221–231.
158. Qidwai T, Khan F. (2011) Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scandinavian J Immunol*. 74:522-547.
159. Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. (2006) Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 47:155–166.
160. Hajeer AH, Hutchinson IV. (2000) TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Micros Res Tech*. 50:216-228.
161. Gao J, Shan G, Sun B, Thompson PJ, Gao X. (2006) Association between polymorphism of tumour necrosis factor alpha-308 gene promoter and asthma: A metaanalysis. *Thorax*. 61:466-71.
162. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P and Layrisse Z. (2004) TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* 64:469-472.
163. Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, Sanchez L, Valdes L, Volk HD, Guzman MG. (2010) Tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor- $\beta$ 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Human Immunology*. 71:1135-1140.



## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı-Soyadı	Meral YILMAZ
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi, 58140- Sivas
Yabancı Dil	İngilizce
E-posta Adresi	meralylmz@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu	
Lise	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Meslek Lisesi, 1990
Önlisans	Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Eskişehir, 1994
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Sivas, 2001
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Sivas, 2005
Doktora	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji, Sivas, 2011

İş Tecrübesi	
Cumhuriyet Üniversitesi	Biyolog, 2003-
Cumhuriyet Üniversitesi	Hemşire, 1990 - 2003

## EK-1

## ETİK KURUL KARARI (2007)

## CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2011/023	Tarih: 13.12.2011		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayhan Koyuncu

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Ayhan Koyuncu	Genel Cerrahi	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Saadetin Kılıçkap	Medikal Onkoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Erol Kisli	Genel Cerrahi	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hülya Toker	Periodontolog	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ziyet Çınar	Biyostatistik ABD	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Köksal Deveci	Biyokimya Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Ali Kaya	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Altun	Tıbbi Farmakoloji Uzmanı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Fatih Kılıçlı	Endokrinoloji Bilim Dalı	Cumhuriyet Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

EK-2

ETİK KURUL KARARI (2010)



T.C.  
Cumhuriyet Üniversitesi  
TIP FAKÜLTESİ  
Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulu

Konu:  
Sayı: 2010/23

21.04.2010

Karar No: 2010-01/20

Yrd.Doç.Dr.İzzet YELKOVAN'ın yürütücüsü olduğu "Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Tanısı Konmuş Hastalarda Interferon-alfa ve Tümör Nekroz Faktör-alfa Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişkilerin Araştırılması" konulu Doktora Tezi Projesinin Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulunca uygun olduğuna;

**Karar verilmiştir.**

Ünvanı/Adı Soyadı	Üye	Uzmanlık Dalı	İmzası
Prof.Dr.M.Kemal YILDIRIM	Başkan	Farmakoloji	
Prof.Dr.Dilara İÇAĞASIOĞLU	Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	Katılmadı
Prof.Dr.Ayhan KOYUNCU	Üye	Genel Cerrahi	Katılmadı
Doç.Dr.Sefa GÜLTÜRK	Üye	Fizyoloji	Katılmadı
Doç.Dr.Yavuz SİLİÇ	Üye	Biyokimya	
Yrd.Doç.Dr.Gülây YILDIRIM	Üye	Deontoloji	
Yrd.Doç.Dr.Ziyne ÇINAR	Üye	Biyoistatistik	

## EK-3

### BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “Kırım-Kongo Kanamalı Ateş (KKKA) (Kene ısırığından 1-3 gün veya 9 gün sonra belirtiler ortaya çıkmaya başlar. İlk belirti genellikle baş ağrısıdır. Daha sonra üşüme-titremler ile yükselen ateş, boğaz ağrısı, aşırı halsizlik ve yorgunluk, yaygın kas ve eklem ağrıları ortaya çıkar. Başlangıç bulguları gribe benzer. Şikayetler; baş dönmesi, ense ağrısı, ışığa karşı hassasiyet, sarılık, duygu-durum değişikliği, ateş ve titremler görülür. Başlangıçta bulantı ve kusma olabilir. Bu belirtilere karın ağrısı ve sulu ishal eşlik edebilir) hastalarında interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) (sırasıyla antiviral ve proinflatuar etkiye sahip sitokinler) gen polimorfizmleri ile ilişkisinin (genlerinde meydana gelmiş değişikliklerin) araştırılmasıdır”

Bu çalışmada, interferon-alfa genlerinde ve TNF- $\alpha$  geninde oluşan polimorfizmler (genlerinde oluşan değişiklikler) ile KKKA hastalığının şiddeti arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada sizin aldığımız tedaviler asla değiştirilmeyecektir. Size herhangi bir ek tedavi yapılmayacaktır. Sadece sizden alınan kan örneğinden elde edilen DNA ile gen polimorfizminin olup olmadığı araştırılacaktır. Bu çalışma için 4ml kan örneği alınacaktır. Bu çalışmada yer almanız için bir defa kan vermeniz yeterli olacaktır. Ayrıca çalışmada yer alacak gönüllülerin sayısı (200 hasta birey ve 200 sağlıklı kontrol) toplam 400'dür.

Bu çalışma ile ilgili olarak istenen kan örneğini vermek, çalışmanın sorularına uygun ve doğru cevap vermek sizin sorumluluklarınızdır.

Bu çalışmada sizin için herhangi bir risk ve zarar söz konusu değildir. Ancak hastalığın seyri hakkında önemli ipuçlarının elde edilmesine katkı sağlayabileceğini düşündüğümüz bu çalışma KKKA hastalarının klinik takibinde ve nedene yönelik tedavide ileride doktorlara yardımcı olacaktır.

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu çalıştırıcı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından karşılanacaktır. Çalışma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Çalışma hakkında ek bilgiler almak için 0 346 2191010 no.lu telefondan Meral YILMAZ'a başvurabilirsiniz.

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır; ayrıca, bu çalışma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu çalışma CÜBAP tarafından desteklenmektedir.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Çalışmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada çalışmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Çalıştırıcı bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, çalışmanın içeriğine göre sizi çalışmadan çıkarabilir. Çalışmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da çalıştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

### **Çalışmaya Katılma Onayı:**

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

### **Gönüllünün,**

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

### **Açıklamaları yapan araştırmacının,**

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

### **Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,**

Adı-Soyadı: Dr. Edip Bayrak

Görevi: Araştırma Görevlisi

Adresi: C.Ü. Tıp Fak. Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Uygulama Hastanesi Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD.

Tel.-Faks:0346 2581060 Fax: 0346 2581305

Tarih ve İmza: 09.04.2010

## EK-4

HEMORRAJİK FEVER TANISI İLE TAKİP EDİLEN HASTALARA AİT  
TAKİP FORMU

ADI SOYADI:

CİNSİYETİ:

YAŞI:

YATIŞ T: //2010

MESLEK: YAŞADIĞI İL: İLÇE:KÖY:

ÇIKIŞ T: //2010

HASTALANDIĞI TARİH: //2010

HAYVANCILIK YAPIYOR YAPMIYOR

YABANİ HAVAN TEMASI: Yok Tavşan Domuz Tilki Diğer

HAYVAN ISIRMASI: Yok Kene Köpek Yabani

AKİBETİ: Salah ile taburcu Yatıyor

Ölüm (enfeksiyondan)

Ölüm (kanamadan)

Ölüm (diğer)

## SEMPTOMLAR

<b>BİLİNÇ:</b>	Açık	Konfüze	Kapalı
<b>Baş ağrısı:</b>	Yok	Hafif	Şiddetli
<b>Kas ağrısı:</b>	Yok	Var	Şiddetli-yaygın
<b>Kırıklık:</b>	Yok	Var	
<b>Boğaz ağrısı:</b>	Yok	Var	
<b>Bulantı:</b>	Yok	Var	
<b>Kusma:</b>	Yok	Var	
<b>İshal:</b>	Yok	Var	
<b>Öksürük:</b>	Yok	Var	
<b>İdrar şikayeti:</b>	Yok	Var	
<b>Ateş:</b>	Yok	Titreyerek artan	Devamlı İntermittan Remittan
<b>Kanama:</b>	Yok	Epistaksis	Hematemez Melena Hematüri Multiple

## BULGULAR

<b>Yüzde hiperemi:</b>	Yok	Var
<b>Ense sertliği:</b>	Yok	Var
<b>Konjunktivit:</b>	Yok	Var
<b>Sarıklık:</b>	Yok	Var
<b>Periton irritasyon bulguları:</b>	Yok	Var
<b>Akciğer dinleme bulguları:</b>	Yok	Var
<b>Hepatomegali:</b>	Yok	Var
<b>Splenomegali:</b>	Yok	Var
<b>Lenfadenopati:</b>	Yok	Tek bölgede var Çok bölgede var
<b>Kalp dinleme bulguları:</b>	Yok	Üfürüm var Aritmi var İkisi de var
<b>Serbest sıvı bulguları:</b>	Yok	Peritonda Plevrada Perikardda 2 bölgede 3 bölgede
<b>Deri döküntüsü:</b>	Yok	Var
<b>Makül Papül</b>		Püstül Peteşi-ekimoz Eritem Vezikül
<b>Yerleşim yeri:</b>	Baş-boyun	Gövde Ekstremitte Gövde-ekstremitte

**LABORATUVAR BULGULARI (BASVURU ANINDA) TARİH: //200**

Trombosit sayısı:  
Hemoglobin:  
Kan lökosit :  
Sedimentasyon :  
PT:  
aPTT:  
ALT  
AST :  
LDH :  
CPK :  
Kan şekeri:  
BUN :  
Kreatinin :  
CRP :  
Proteinüri:  
Hematüri:  
D-dimer:  
Coxiella IgM Wright agg testi:  
Weil-felix

**UYGULANAN TEDAVİLER :**

Oral ribavirin tedavisi: Uygulandı ( //200 )	Uygulanmadı
Kan ve kan ürünleri (Ünite)	
Trombosit suspansiyonu: Eritrosit suspansiyonu :	Taze donmuş plazma:

EK-5  
KONTROL GRUBU TAKİP FORMU

ADI-SOYADI:

YAŞI:

CİNSİYETİ:

MESLEĞİ

SOSYO-EKONOMİK DÜZEY

YAŞADIĞI YER:

BİLİLEN HERHANGİ BİR HASTALIK ÖYKÜSÜ (renal ve pankreatik yetmezlik, gastrointestinal, akut kardiyovasküler, serebrovasküler hastalık ve hipertiroidizm öyküsü)

AİLEDE GENETİK HASTALIK ÖYKÜSÜ

Çalışmaya Alınacak Bireylerin Özellikleri; hasta grubunda yer alan bireylerle,

1. Aynı yörede bulunan,
2. Yaşam özellikleri benzer olan,
3. Yaş ve cinsiyetleri hasta grubu ile uyumlu olan,
4. Bilinen mevcut hastalığı olmayan,

Adı Soyadı:

Yaşı: